

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Ação de decocções de *Artemisia absinthium* no tratamento do
cancro**

Joana do Carmo Silva Catarro

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:
Prof. Doutor Pedro Luís Vieira Falé

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, como estabelecimento que me acolheu durante estes dois anos de Mestrado em Bioquímica Médica e me permitiu realizar esta dissertação.

Ao meu orientador Professor Doutor Pedro Luís Vieira Falé, que orientou esta dissertação, pela ajuda prestada na concretização da mesma, pela disponibilidade e por todos os conhecimentos que me transmitiu.

À Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro, por todo o apoio, ajuda e transmissão de conhecimentos, durante a realização deste trabalho.

À Doutora Maria da Conceição Oliveira, do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, pela sua disponibilidade, simpatia e ajuda na análise de Espectrometria de Massa realizada neste trabalho.

Quero agradecer especialmente aos meus pais e irmão, os meus pilares, pelo apoio imprescindível, por estarem sempre presentes ao longo destes dois anos, por nunca me terem deixado baixar os braços, por toda a paciência, mas também pelo carinho e compreensão. Reconheço que sem eles e sem o seu apoio constante esta dissertação não seria a mesma!

Ao Rui, por tudo! Em especial pela força e apoio constante, por sempre acreditar em mim e nas minhas capacidades, por me ajudar a atingir os meus objetivos, pela paciência e compreensão a dobrar. Um obrigada será sempre pouco!

Às minhas amigas e amigos, as minhas pessoas-sol, que sempre acreditaram em mim, por todo o apoio e ajuda que me deram, pela preocupação nestes últimos meses, por me ouvirem sempre que precisei, e pela compreensão nas ausências.

Aos meus colegas de Laboratório, André Silva, Asma Ressaissi, Bruno Gonçalves e Joana Henriques, pela companhia e ajuda prestada durante a realização desta dissertação. Quero ainda agradecer, em especial, às minhas colegas Rebeca Esperança André, Laura Guedes e Violeta Railean por todos os momentos partilhados dentro e fora da faculdade, pela ajuda e apoio durante a realização desta dissertação, e por toda a amizade construída e insubstituível! Obrigada por vos ter tido comigo nesta etapa, não poderia ter tido mais sorte!

A todos, um enorme obrigada!

RESUMO

Artemisia absinthium, conhecida como losna, tem sido usada tradicionalmente para fins terapêuticos, e demonstrado possuir atividades antimaláricas e anticancerígenas, tornando-se potencial para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do cancro. O principal objetivo da presente dissertação foi avaliar o efeito *in vitro* da decocção da planta *A. absinthium*, a nível celular, em linhas celulares cancerígenas humanas, e o efeito em conjunto com fármacos de quimioterapia do cancro.

O extrato de *A. absinthium* foi preparado como decocção das folhas e caules secos desta planta, e os compostos bioativos foram identificados e quantificados por HPLC-DAD e LC-MSⁿ. Foram realizados ensaios de metabolismo *in vitro* da decocção, por suco gástrico e pancreático artificiais. Foi determinada a atividade antioxidante da decocção pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A citotoxicidade foi avaliada em linhas celulares cancerígenas humanas HeLa, MCF-7 e Caco-2. Para explicar as alterações bioquímicas que ocorrem nas células HeLa e MCF-7 depois da ingestão da decocção, analisou-se o efeito da decocção na composição destas células por espectroscopia de FTIR. Os perfis proteicos de células HeLa e MCF-7, quando expostas à decocção, foram analisados por eletroforese SDS-PAGE e HPLC-DAD. A ação da decocção na citotoxicidade da cisplatina foi avaliada na linha celular HeLa usando combinações do fármaco quimioterápico com decocção, e foram analisadas as alterações bioquímicas que ocorrem em células HeLa expostas a esta combinação por espectroscopia de FTIR.

Os compostos bioativos maioritariamente identificados no extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* foram compostos fenólicos, revelando hexósido do ácido hidroxiferúlico e isómeros, ácido 5-*O*-cafeoilquinico (ácido clorogénico), ácido 1,5-*O*-dicafeoilquinico (cinarina) e isómeros deste e apigenina-6,8-di-*C*-glucósido (vicenina-2), sendo ácido clorogénico e cinarina os principais componentes. Observou-se que a digestão gástrica *in vitro* não alterou a composição química da decocção, demonstrando-se que os compostos fenólicos na decocção da planta são estáveis sob as condições do trato gastrointestinal superior, e que a digestão pancreática *in vitro* pode ter originado pequenas alterações na decocção, no entanto os compostos maioritários continuaram a estar presentes sob condições de intestino delgado. A decocção apresentou alguma atividade antioxidante *in vitro* (EC₅₀ = 62,32 ± 1,49 µg/mL), pela capacidade de extinção do radical DPPH. Relativamente à toxicidade da decocção, os resultados obtidos mostraram que esta não é citotóxica na linha celular HeLa, MCF-7 e Caco-2, no entanto estas responderam de forma diferente às concentrações de extrato testadas. Em concentrações sub-tóxicas, a decocção provocou alterações na composição bioquímica de células HeLa e MCF-7, que sugerem que pode estar a provocar morte celular por apoptose, e alterou os perfis de proteínas do citosol de células HeLa e MCF-7, observado na análise por HPLC-DAD e análise eletroforética. Estudos da combinação de cisplatina com decocção em células HeLa, revelaram que o extrato potenciou o efeito citotóxico da cisplatina, e provocou alterações na composição bioquímica das células.

Estes resultados sugerem assim que a decocção da planta *A. absinthium* tem efeito a nível celular, e que pode alterar o efeito do fármaco quimioterápico cisplatina quando em combinação. Estas alterações levam a não recomendar a combinações não supervisionadas de fármaco e decocção de *A. absinthium*, mas mais estudos de dose resposta poderão levar ao desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do cancro.

Palavras-chave: *Artemisia absinthium*, ácido clorogénico, cancro, quimioterapia, espectroscopia de FTIR.

ABSTRACT

Artemisia absinthium, also known as “losna”, has been used for medicinal purposes since antiquity and has revealed to have antimalarial and anticancer properties, having great potential for the development of new strategies for cancer treatment. The main objective of this dissertation was to evaluate the *in vitro* effect of the decoction of *A. absinthium* at cellular level in human cancer cell lines, and the effect of the aqueous extract in combination with cancer chemotherapy drugs.

The extract of *A. absinthium* was prepared as decoction of dry leaves and stalks, and the bioactive compounds were identified and quantified by HPLC-DAD and LC-MSⁿ. The gastrointestinal metabolism of the decoction was analysed using artificial gastric and pancreatic juice. Antioxidant activity of the aqueous extract was determined by the DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and cytotoxicity was evaluated in human cancer cell lines HeLa, MCF-7 and Caco-2. To explain the biochemical changes occurred in HeLa and MCF-7 cells after the ingestion of the decoction, the effect of the decoction on the composition of these cells was analyzed by FTIR spectroscopy. Furthermore, protein profiles of HeLa and MCF-7 cells, when exposed to the plant extract, were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and HPLC-DAD. The action of the extract on the cytotoxicity of cisplatin was evaluated in the HeLa cells using different combinations of chemotherapeutic drug with the aqueous extract. FTIR spectroscopy was used to analyse the biochemical changes that occurred when the HeLa cells were exposed to the combination of cisplatin and the aqueous extract.

The bioactive compounds identified in the aqueous extract of the decoction of the *A. absinthium*, were phenolic compounds, namely hydroxyferulic acid hexoside and isomers, 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), 1,5-*O*-dicaffeoylquinic acid (cynarin) and its isomers and also apigenin-6,8-di-*C*-glucoside (vicenin-2). The main components were chlorogenic acid and cynarin. *In vitro* gastric digestion did not alter the chemical composition of the plant decoction, demonstrating that the phenolic compounds in the plant decoction are stable under upper gastrointestinal conditions, and *in vitro* pancreatic digestion may have caused small changes in the decoction, but majority component remain present after undergoing small intestine conditions. The aqueous extract of the plant revealed antioxidant activity *in vitro* ($EC_{50} = 62,32 \pm 1,49 \mu\text{g/mL}$), as DPPH radical extinction capacity. Regarding the toxicity of the aqueous extract, the results revealed that it is not cytotoxic for HeLa, MCF-7 and Caco-2 cells, however these cell lines responded differently to the extract concentrations tested. In subtoxic concentrations, the aqueous extract caused changes in the biochemical composition of HeLa and MCF-7 cells, suggesting that it may be causing cell death by apoptosis, and altered the cytosol protein profiles of the same cell lines, observed by HPLC-DAD and by electrophoretic analysis. Studies of cisplatin combinations with aqueous extract revealed that the extract potentiated the cytotoxic effect of cisplatin in HeLa cells, and changed cells' biochemical composition.

These results suggest that *A. absinthium* decoctions have an effect at cellular level, and when ingested in combination with the chemotherapeutic drug cisplatin the effects of the drug can be changed. Therefore, unsupervised combinations of drug and extract are not recommended, but further dose-response studies may reveal the potential for the development of new cancer treatment strategies.

Keywords: *Artemisia absinthium*, chlorogenic acid, cancer, chemotherapy, FTIR spectroscopy.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract	v
Índice.....	vii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Abreviaturas e Convenções	xv
Capítulo I: Introdução	1
1.1 Problemática.....	3
1.2 Utilização de plantas para fins medicinais	4
1.3 O cancro	5
1.3.1 Tratamento do cancro	6
1.3.1.1 Quimioterapia.....	6
1.3.1.1.1 Cisplatina.....	7
1.3.1.2 Tratamento com agentes derivados de plantas	8
1.4 <i>Artemisia absinthium</i>	8
1.5 Compostos Fenólicos	9
1.5.1 Ácidos fenólicos	10
1.5.2 Flavonoides	11
Capítulo II: Objetivos.....	13
Capítulo III: Procedimento Experimental	17
3.1 Materiais.....	19
3.1.1 Material vegetal	19
3.1.2 Reagentes.....	19
3.1.3 Cultura de linhas celulares.....	19
3.2 Métodos	20
3.2.1 Preparação do extrato aquoso de <i>Artemisia absinthium</i>	20
3.2.2 Análise do extrato aquoso por HPLC-DAD	20
3.2.3 Análise do extrato aquoso por LC-MS ⁿ	20
3.2.4 Ensaios de metabolismo <i>in vitro</i> do extrato aquoso por suco gástrico e suco pancreático artificiais.....	21
3.2.4.1 Digestão gástrica do extrato de <i>A. absinthium in vitro</i>	21
3.2.4.2 Digestão pancreática do extrato de <i>A. absinthium in vitro</i>	21

3.2.5	Determinação da atividade antioxidante.....	21
3.2.6	Determinação da citotoxicidade em linhas celulares.....	22
3.2.6.1	Determinação da citotoxicidade do extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> em HeLa, MCF-7 e Caco-2.....	22
3.2.6.2	Determinação da citotoxicidade de compostos padrão em HeLa.....	23
3.2.7	Análise de alterações a nível celular por espectroscopia de FTIR	23
3.2.7.1	Análise de alterações nas linhas celulares HeLa e MCF-7 provocadas pelo extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> através de espectroscopia de FTIR.....	23
3.2.7.2	Análise de alterações na linha celular HeLa provocadas por compostos padrão através de espectroscopia de FTIR	24
3.2.8	Análise Eletroforética SDS-PAGE de proteínas após exposição das linhas celulares HeLa e MCF-7 ao extrato aquoso de <i>A. absinthium</i>	25
3.2.9	Análise do perfil proteico das linhas celulares HeLa e MCF-7 após exposição ao extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> , por HPLC-DAD	26
3.2.9.1	Análise de proteínas do citosol de células HeLa e MCF-7 controlo e expostas a extrato de <i>A. absinthium</i> , por HPLC-DAD	27
3.2.9.2	Análise de péptidos provenientes da hidrólise enzimática de proteínas do citosol de células HeLa e MCF-7 controlo e expostas a extrato de <i>A. absinthium</i> , por HPLC-DAD....	27
3.2.10	Análise de dados.....	28
Capítulo IV: Resultados e Discussão		29
4.1	Composição química do extrato aquoso de <i>Artemisia absinthium</i>	31
4.2	Identificação de compostos presentes no extrato da decocção de <i>A. absinthium</i> por LC-MS ⁿ	32
4.3	Quantificação de ácido clorogénico e cinarina no extrato aquoso	39
4.4	Metabolismo <i>in vitro</i> do extrato aquoso de <i>A. absinthium</i>	39
4.4.1	Digestão do extrato aquoso pelo suco gástrico artificial	39
4.4.2	Digestão do extrato aquoso pelo suco pancreático artificial	41
4.5	Atividade antioxidante da decocção da planta <i>A. absinthium</i>	42
4.6	Determinação da citotoxicidade do extrato de <i>A. absinthium</i> em HeLa, MCF-7 e Caco-2...	43
4.7	Deteção de alterações bioquímicas em células HeLa e MCF-7 após exposição ao extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> , por FTIR.....	46
4.8	Análise eletroforética de proteínas de células HeLa e MCF-7 expostas ao extrato de <i>A. absinthium</i>	52
4.9	Análise de proteínas de células HeLa e MCF-7 expostas ao extrato de <i>A. absinthium</i> por HPLC-DAD.....	54
4.10	Ação do extrato de <i>A. absinthium</i> na citotoxicidade do fármaco cisplatina em células HeLa.....	60

4.11 Detecção de alterações bioquímicas em células HeLa por efeito do extrato de <i>A. absinthium</i> na ação da cisplatina, por espectroscopia de FTIR	63
Capítulo V: Conclusão e Perspetivas Futuras	69
Capítulo VI: Referências Bibliográficas	73
Capítulo VII: Anexos	xvii

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura química da cisplatina (adaptado de Weiss & Christian, 1993).	7
Figura 1.2: <i>Artemisia absinthium</i> (adaptado de Jardim Botânico UTAD, 2017).	9
Figura 1.3: Estrutura química do ácido clorogénico (adaptado de Falé, 2011).	10
Figura 1.4: Estrutura básica de um flavonoide (adaptado de Ross & Kasum, 2002).	11
Figura 4.1: Cromatograma de HPLC-DAD de extrato aquoso de <i>Artemisia absinthium</i> (1 mg/mL). ...	31
Figura 4.2: Espectros de absorção UV-Vis obtidos por HPLC-DAD para A) pico 3 (Tr = 8,49 min) e B) pico 6 (Tr = 13,23 min) do extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (1 mg/mL); C) padrão ácido clorogénico a 100 µM (Tr = 8,18 min) e D) padrão cinarina a 100 µg/mL (Tr = 13,07 min).	32
Figura 4.3: Espectro LC-MS/MS do composto 1 (Tr = 5,32 min).	34
Figura 4.4: Espectro LC-MS/MS do composto 2 (Tr = 6,26 min).	34
Figura 4.5: Espectro LC-MS/MS do composto 3 (Tr = 8,49 min).	35
Figura 4.6: Espectro LC-MS/MS do composto 4 (Tr = 9,93 min).	36
Figura 4.7: Espectro LC-MS/MS do composto 5 (Tr = 12,79 min).	37
Figura 4.8: Espectro LC-MS/MS do composto 6 (Tr = 13,23 min).	37
Figura 4.9: Espectro LC-MS/MS do composto 7 (Tr = 14,60 min).	38
Figura 4.10: Cromatogramas médios obtidos por HPLC-DAD antes (0h) e após (4h) digestão do extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> com suco gástrico artificial ou incubado com água (controlo).	40
Figura 4.11: Cromatogramas médios obtidos por HPLC-DAD antes (0h) e após (4h) a digestão do extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> com suco pancreático artificial ou incubado com água (controlo).	41
Figura 4.12: Viabilidade celular (%) de células HeLa, MCF-7 e Caco-2 na presença de concentrações crescentes de extrato aquoso de <i>A. absinthium</i>	44
Figura 4.13: Viabilidade celular (%) de células HeLa na presença de concentrações crescentes do padrão ácido clorogénico.	45
Figura 4.14: Espectros médios de FTIR de células HeLa controlo (sem tratamento, apenas em meio) e de células HeLa expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₅ = 0,40 mg/mL) e expostas a ácido clorogénico (50 µM).	47
Figura 4.15: Razões médias das bandas de absorção dos espectros de FTIR de células HeLa controlo (sem tratamento, apenas em meio) e de células HeLa expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₅ = 0,40 mg/mL) e expostas a ácido clorogénico (50 µM).	48
Figura 4.16: Espectros médios de FTIR de células MCF-7 controlo (sem tratamento) e de células MCF-7 expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₀ = 0,35 mg/mL).	50
Figura 4.17: Razões médias das bandas de absorção dos espectros de FTIR de células MCF-7 controlo (sem tratamento, apenas em meio) e de células MCF-7 expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₀ = 0,35 mg/mL).	51
Figura 4.18: Eletroforese SDS-PAGE de amostras proteicas de células HeLa expostas a extrato de <i>A. absinthium</i> (Ext 1 e Ext 2) e de células controlo (Cont).	52

Figura 4.19: Densitometria da eletroforese SDS-PAGE de amostras proteicas de células HeLa expostas a extrato de <i>A. absinthium</i> (Extrato 2) e de células controlo.....	53
Figura 4.20: Eletroforese SDS-PAGE de amostras proteicas de células MCF-7 expostas a extrato de <i>A. absinthium</i> (Ext 1 e Ext 2) e de células controlo (Cont 1 e Cont 2).....	53
Figura 4.21: Densitometria da eletroforese SDS-PAGE de amostras proteicas de células MCF-7 expostas a extrato de <i>A. absinthium</i> (Extrato 2) e de células controlo (Controlo 2).	54
Figura 4.22: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) de sobrenadantes acetona da precipitação de proteínas de células HeLa controlo e expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₅ = 0,40 mg/mL), e da solução de tampão de lise e acetona.	55
Figura 4.23: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) de sobrenadantes do precipitado de proteínas de células HeLa controlo e expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₅ = 0,40 mg/mL).....	56
Figura 4.24: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) da hidrólise, com pepsina, de proteínas de células HeLa controlo e expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₅ = 0,40 mg/mL).	57
Figura 4.25: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) de sobrenadantes acetona da precipitação de proteínas de células MCF-7 controlo e expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₀ = 0,35 mg/mL), e da solução de tampão de lise e acetona.	58
Figura 4.26: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) de sobrenadantes do precipitado de proteínas de células MCF-7 controlo e expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₀ = 0,35 mg/mL).....	58
Figura 4.27: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) da hidrólise, com pepsina, de proteínas de células MCF-7 controlo e expostas a extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₀ = 0,35 mg/mL).	59
Figura 4.28: Viabilidade celular (%) de células HeLa na presença de concentrações crescentes de cisplatina sozinha, cisplatina juntamente com extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₅ = 0,40 mg/mL) e cisplatina juntamente com padrão ácido clorogénico (50 µM).	60
Figura 4.29: Viabilidade celular (%) de células HeLa na presença de concentrações crescentes de H ₂ O ₂ sozinha, H ₂ O ₂ juntamente com extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (IC ₂₅ = 0,40 mg/mL) e H ₂ O ₂ juntamente com padrão ácido clorogénico (50 µM).	61
Figura 4.30: Espectros médios de FTIR de células HeLa controlo (sem tratamento, apenas em meio), células HeLa expostas a cisplatina sozinha (IC ₂₀ = 2,98 µM), expostas a cisplatina combinada com IC ₂₅ extrato de <i>A. absinthium</i> (IC ₇ = 0,92 µM), expostas a cisplatina combinada com 50 µM ácido clorogénico (IC ₂₀ = 3,77 µM), expostas a H ₂ O ₂ sozinha (IC ₂₀ = 31,88 µM), expostas H ₂ O ₂ combinado com IC ₂₅ extrato de <i>A. absinthium</i> (IC ₇ = 8,46 µM) e expostas a H ₂ O ₂ combinado com 50 µM ácido clorogénico (IC ₂₀ = 31,26 µM).	64
Figura 4.31: Razões médias das bandas de absorção dos espectros de FTIR de células HeLa controlo (sem tratamento, apenas em meio) e de células HeLa expostas a cisplatina sozinha (IC ₂₀ = 2,98 µM), expostas a cisplatina combinada com IC ₂₅ extrato de <i>A. absinthium</i> (IC ₇ = 0,92 µM), expostas a cisplatina combinada com 50 µM ácido clorogénico (IC ₂₀ = 3,77 µM), expostas a H ₂ O ₂ sozinha (IC ₂₀ = 31,88 µM), expostas H ₂ O ₂ combinado com IC ₂₅ extrato de <i>A. absinthium</i> (IC ₇ = 8,46 µM) e expostas a H ₂ O ₂ combinado com 50 µM ácido clorogénico (IC ₂₀ = 31,26 µM).	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1: Identificação de compostos fenólicos do extrato aquoso de <i>A. absinthium</i>	33
Tabela 4.2: Valores de concentração de ácido clorogénico (μM), cinarina ($\mu\text{g/mL}$) e isómeros desta, no extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> (1 mg/mL), obtidos pelas retas de calibração.....	39
Tabela 4.3: Valores das percentagens dos compostos correspondentes aos picos maioritários 3 a 7 do extrato da planta <i>A. absinthium</i> , após as 4 horas de digestão gástrica.	40
Tabela 4.4: Valores das percentagens dos compostos correspondentes aos picos maioritários 3 a 7 do extrato da planta <i>A. absinthium</i> , após as 4 horas de digestão pancreática.....	42
Tabela 4.5: Valor de EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso de <i>A. absinthium</i>	42
Tabela 4.6: Citotoxicidade do extrato aquoso de <i>A. absinthium</i> em células HeLa, MCF-7 e Caco-2. 44	
Tabela 4.7: Principais bandas de absorção de infravermelho dos espectros de FTIR e atribuições aos respetivos componentes químicos das células.....	46
Tabela 4.8: Citotoxicidade de vários compostos em células HeLa.	62

ABREVIATURAS E CONVENÇÕES

a.C.: Antes de Cristo

ATCC: do inglês – *American Type Culture Collection*

BHT: Hidroxitolueno butilado (do inglês – *Butylated hydroxytoluene*)

c.d.o: Comprimento de onda

DAD: Detetor de matriz de díodos (do inglês – *Diode array detector*)

d.p.: Desvio padrão

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (do inglês – *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

DTGS: Sulfato de triglicina deuterada (do inglês – *Deuterated triglycine sulfate*)

DTT: Ditiotreitól (do inglês – *Dithiothreitol*)

EC₅₀: Concentração que provoca 50% de extinção do radical DPPH (do inglês – *Efficient concentration*)

ESI: Ionização por *electrospray* (do inglês – *Electrospray ionization*)

FBS: Soro fetal bovino (do inglês – *Fetal Bovine Serum*)

FTIR: Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês – *Fourier transform infrared*)

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês – *High performance liquid chromatography*)

IC₅₀: Concentração que provoca inibição de 50% da viabilidade celular (do inglês – *Inhibitory concentration*)

LC-MSⁿ: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (do inglês – *Liquid chromatography sequential-mass spectrometry*)

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa *tandem* (do inglês – *Liquid chromatography tandem-mass spectrometry*)

MM: Massa molar

MSⁿ: Espectrometria de massa sequencial (do inglês – *Sequential mass spectrometry*)

MS/MS: Espectrometria de massa *tandem* (do inglês – *Tandem mass spectrometry*)

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (do inglês – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

m/z: Razão entre massa e carga do ião

PBS: Tampão de sais de fosfato (do inglês – *Phosphate buffered saline*)

Pen-Strep: Mistura de penicilina e estreptomicina

ROS: Espécies reativas de oxigénio (do inglês – *Reactive oxygen species*)

RPMI: do inglês – *Roswell Park Memorial Institute medium*

SDS: Dodecilsulfato de sódio (do inglês – *Sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (do inglês – *Polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate*)

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina (do inglês - *N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*)

Tr: Tempo de retenção

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta visível

ν : Vibração de estiramento

ν_{as} : Vibração de estiramento assimétrica

ν_s : Vibração de estiramento simétrica

λ_{max} : Comprimento de onda de absorção máxima

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Problemática

O cancro é a segunda causa de morte em todo o mundo após doenças cardiovasculares (Kooti et al., 2017), existindo uma procura constante de novas terapias para tratar e prevenir esta doença (Greenwell & Rahman, 2015). Os tratamentos de cancro atuais incluem a quimioterapia, usando agentes como cisplatina com atividade clínica contra uma grande variedade de tumores sólidos (Siddik, 2003), e a radioterapia. No entanto, apesar dos progressos realizados no desenvolvimento de potentes fármacos para quimioterapia, a sua toxicidade para os tecidos normais e os efeitos secundários adversos em múltiplos sistemas de órgãos, bem como a resistência aos fármacos, continuaram a ser os principais obstáculos para o uso clínico bem-sucedido (Sak, 2012).

Deste modo, à custa desses efeitos secundários graves da quimioterapia, bem como da radioterapia, e devido à alta taxa de mortalidade associada ao cancro, muitos pacientes com cancro procuram alternativas e/ou métodos complementares de tratamento (Greenwell & Rahman, 2015). Assim, há necessidade de estudos sobre a eficácia e segurança de tomar produtos naturais para tratamento de cancro, e em combinação com fármacos quimioterápicos. Há uma constante necessidade de desenvolver medicamentos anticancerígenos alternativos ou sinérgicos com efeitos secundários menores, e uma estratégia importante para desenvolver novos agentes anticancerígenos é explorar agentes anticancerígenos derivados de fontes naturais, como agentes de plantas medicinais e os seus derivados, que demonstraram ser eficazes para a prevenção e terapêutica do cancro (Ali et al., 2012). Para além disso, diferentes compostos naturais podem melhorar a eficiência de agentes quimioterápicos e diminuem a resistência a esses fármacos (Sak, 2012).

O consumo de infusões de plantas para prevenção e tratamento de distúrbios de saúde é uma prática comum (Marques & Farah, 2009) e, os chás de ervas podem ser considerados como bebidas funcionais, pois, são geralmente tomados pelas atividades atribuídas aos componentes químicos desses extratos aquosos (Falé et al., 2011). Os compostos químicos derivados de plantas descobertos que exibem propriedades anticancerígenas, são por exemplo os compostos fenólicos, formando uma das classes mais importantes e amplamente utilizadas de agentes terapêuticos, derivados de plantas, para prevenção ou quimioterapia do cancro (Ali et al., 2012).

Assim, pretende-se neste estudo investigar a ação *in vitro* de extrato aquoso da decocção de *Artemisia absinthium* – uma planta que já demonstrou possuir atividades anticancerígenas (Shafi et al., 2012) – em linhas celulares cancerígenas humanas, sozinho ou em combinação com o agente quimioterápico cisplatina.

1.2 Utilização de plantas para fins medicinais

Todas as culturas e civilizações desenvolveram e fomentaram os seus próprios sistemas terapêuticos, utilizando os recursos biológicos e materiais inorgânicos disponíveis localmente, através de observações e inferências empíricas (Sharma et al., 2012). Assim a utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a própria humanidade, sendo que a conexão entre o Homem e a sua procura por fármacos na natureza remonta ao passado distante, existindo uma ampla evidência de várias fontes históricas relevantes como documentos escritos, como o livro chinês "Pen T'Sao" (escrito por volta de 2500 a.C.), o Papiro de Ebers (escrito em 1550 a.C.), as obras de Hipócrates (459-370 a.C.) e a obra "De Materia Medica" do "pai da farmacognosia", Dioscórides (Petrovska, 2012).

Atualmente, com a difusão do conhecimento de práticas tradicionais de várias populações mundiais, continua cada vez mais viva a prática da medicina tradicional – conjunto de práticas, abordagens, conhecimentos e crenças de saúde que incorporam medicamentos à base de plantas, animais e/ou minerais, terapias espirituais e técnicas manuais para manter o bem-estar, tratar, diagnosticar ou prevenir doenças (Petrovska, 2012; World Health Organization, 2002). A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população de alguns países africanos e asiáticos atualmente usam a medicina tradicional para ajudar a atender às suas necessidades de cuidados de saúde primários (World Health Organization, 2002).

Sabe-se que as plantas têm a capacidade de produzir uma ampla gama de compostos químicos que são usados para desempenhar importantes funções biológicas, sendo que muitos destes compostos são designados de fitoquímicos, que têm efeitos benéficos na saúde a longo prazo quando consumidos pelo Homem e podem ser utilizados para tratar eficazmente doenças humanas (Elumalai & Eswariah, 2012). Estes fitoquímicos são divididos em metabolitos primários, que são encontrados em todas as plantas, e metabolitos secundários, que se encontram numa gama mais pequena de plantas, servindo uma função mais específica. São estes metabolitos secundários e pigmentos que podem ter ações terapêuticas em seres humanos, visto que exibem propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras, diuréticas, inflamatórias e até mesmo anticancerígenas, e que podem ser refinados para produzir fármacos (Elumalai & Eswariah, 2012; Pohl et al., 2016).

Os objetivos da utilização de plantas como fontes de agentes terapêuticos são, não só isolar compostos bioativos para utilização direta como fármacos, como também produzir compostos bioativos de estruturas novas ou conhecidas como compostos para semisíntese (para produzir entidades patenteáveis de maior atividade e/ou menor toxicidade) e ainda, preparação de remédios herbais utilizando as plantas inteiras ou parte delas (Fabricant & Farnsworth, 2001). Assim sendo, pode presumir-se com segurança que uma grande parte da terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou dos seus princípios ativos (Farnsworth et al., 1985). Existem várias formas nas quais as plantas medicinais podem ser consumidas, sendo as mais comuns em forma de infusões ou decocções, preparadas a partir de diferentes partes das plantas tal como ervas, flores, frutos, folhas, sementes, cascas e raízes (Pohl et al., 2016).

Refletindo em números a adoção de plantas para fins terapêuticos, estima-se que aproximadamente 25% de todos os fármacos modernos usados nos Estados Unidos foram derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais, e que no caso de algumas classes de produtos farmacêuticos essa percentagem pode ser maior que 60%, como nos fármacos antitumorais e antimicrobianos (Elumalai & Eswariah, 2012; Ministério da Saúde, 2012).

1.3 O cancro

De acordo com a *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde) o cancro é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, designado como um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo, e que são caracterizadas pelo crescimento anormal de células além dos limites habituais (World Health Organization, 2017).

Segundo as estatísticas do projeto GLOBOCAN 2012, nesse ano, em todo o mundo, ocorreram 14,1 milhões de novos casos de cancro, 8,2 milhões de mortes devido à doença e 32,6 milhões de pessoas a viver com cancro 5 anos após o diagnóstico (Ferlay et al., 2013). O cancro do pulmão continua a ser o cancro mais comum do mundo, tanto em termos de novos casos (1,8 milhões de casos) como de mortes (1,6 milhões), sendo o cancro da mama o segundo mais comum no geral e também o cancro mais comum em mulheres, com cerca de 1,67 milhões de novos casos diagnosticados, no ano de 2012, por todo o mundo (25% de todos os casos de cancro incidentes). Este último é a quinta causa mais comum de morte por cancro em geral, com uma estimativa de 522 000 mortes em 2012 (Ferlay et al., 2014). Em termos de incidência, estes cancros são seguidos pelo cancro colorretal (1,4 milhões de casos), cancro da próstata (1,1 milhões de casos), cancro de estômago (951,000 casos) e cancro de fígado (782,000 casos) (Ferlay et al., 2014).

O cancro, também designado de tumor maligno ou neoplasia maligna, envolve uma quebra patológica nos processos que controlam a proliferação celular, diferenciação e morte de células particulares (Stewart & Kleihues, 2003a). Várias evidências indicam que o processo de carcinogénese, formação de cancro, é um processo com três etapas distintas, designadas por iniciação, promoção e progressão (Klaunig et al., 2000). A primeira etapa envolve a formação de uma célula pré-neoplásica resultante de várias mutações no material genético, DNA, impossível de reparar, causada por fatores carcinogénicos (Klaunig et al., 2000; Baba & Căttoi, 2007). Na promoção, as alterações genéticas crónicas da célula que foi “iniciada”, determinam a transformação neoplásica e o aparecimento de células que são capazes de crescimento autónomo (Baba & Căttoi, 2007), assim esta etapa envolve a expansão clonal seletiva dessa célula através de um aumento no crescimento celular ou uma diminuição da apoptose (Klaunig et al., 2000). Por fim na etapa de progressão, as células são caracterizadas por mudanças genéticas, alterações nos genes e rearranjos, mesmo as alterações do cariótipo, e o tumor é caracterizado fenotipicamente por um ritmo de proliferação rápido, propriedades invasivas e metastatizantes, com mudanças bioquímicas e morfológicas (Baba & Căttoi, 2007). Assim o último passo na progressão tumoral é a metástase, que se refere à disseminação de células tumorais em locais distantes da neoplasia primária, através do sangue ou da circulação linfática (Stewart & Kleihues, 2003b).

Mais comumente, as células malignas que formam um tumor surgem do tecido epitelial e são chamados de carcinoma, sendo que em muitos órgãos (mama, pulmão, intestino, etc.), a maioria dos cancros são carcinomas (Stewart & Kleihues, 2003a).

Os diferentes tipos de cancro têm diferentes causas e mostram ainda diferentes respostas aos tratamentos aplicados. Em geral, existem várias causas conhecidas de cancro, sendo o tabagismo a principal causa de morte relacionada com o cancro humano em todo o mundo, causando principalmente cancro do pulmão. Sabe-se que também o consumo excessivo de álcool causa vários tipos de cancro, como cancro da faringe, laringe, esófago e fígado. Outros fatores também estão relacionados com o cancro, como a luz solar (fonte mais significativa de irradiação ultravioleta) que pode causar vários tipos de cancro de pele; alguns produtos químicos específicos (ou misturas químicas) para os quais as exposições são principalmente ocupacionais (no local de trabalho), foram também estabelecidos como agentes cancerígenos humanos, como é o caso do amianto e os metais pesados; uma variedade de agentes infecciosos constituem também uma das principais causas de cancro, principalmente os vírus (Stewart & Kleihues, 2003c).

1.3.1 Tratamento do cancro

Cada tipo de cancro requer um tratamento específico que inclui a cirurgia, radioterapia e quimioterapia (principais tratamentos), ou até mesmo a combinação destas. Tanto cirurgia como radioterapia são tratamentos essencialmente locais, direcionados ao tumor primário e a qualquer doença loco-regional, a quimioterapia é um tratamento sistémico e pode tratar metástases distantes (Sridhar & Symonds, 2009).

1.3.1.1 Quimioterapia

A quimioterapia tem sido usada para o tratamento do cancro já há quase 70 anos, e o fato de ser uma terapia sistémica garante que o tratamento anticancerígeno atinge todos os locais da doença, incluindo lesões micrometastáticas, sendo uma clara vantagem sobre a cirurgia e a radioterapia (Sak, 2012; Bhosle & Hall, 2009).

A maioria dos fármacos quimioterapêuticos atingem a maquinaria do ciclo celular, causando danos no DNA ou prevenindo a replicação cromossômica, o que leva à morte celular programada (apoptose), mas os efeitos letais destes variam entre as diferentes fases do ciclo celular (Sak, 2012; Bhosle & Hall, 2009; Sridhar & Symonds, 2009). As categorias mais importantes de agentes quimioterapêuticos usados no tratamento do cancro incluem:

- Agentes de alquilação, que interferem com o emparelhamento das bases de DNA, levando a quebras na cadeia e inibição da replicação do DNA (Monsuez et al., 2010). Exemplos destes agentes são o clorambucilo (utilizado extensivamente na leucemia linfática crónica), e a ciclofosfamida e a ifosfamida (que têm atividade contra cancro do ovário e carcinomas escamosos do colo do útero) (Lind, 2008; Sridhar & Symonds, 2009);
- Anti-metabolitos, que são agentes citotóxicos que geralmente têm estrutura semelhante a metabolitos celulares e atuam na fase S do ciclo celular. Têm dois modos de ação, a inibição de enzimas chave envolvidas na síntese de DNA e a incorporação em DNA para causar quebras da cadeia ou terminação prematura da cadeia (Lind, 2008). Exemplos destes são, o metotrexato (comumente usado na terapia de manutenção para leucemia linfoblástica aguda), e o 5-fluorouracilo (English, 2010; Sridhar & Symonds, 2009);
- Antibióticos anti-tumorais, sendo os mais importantes as antraciclinas, que inibem a síntese do DNA, a doxorubicina (adriamicina) e a epirubicina, que são amplamente usados no tratamento do cancro da mama e de sarcomas uterinos (Sridhar & Symonds, 2009);
- Taxanos, como o paclitaxel e docetaxel que atuam contra os microtúbulos para induzir um bloqueio sustentado na mitose celular (têm atividade no tratamento do cancro do ovário) (Sridhar & Symonds, 2009);
- Compostos de platina, que formam ligações cruzadas com o DNA por uma ação semelhante aos agentes alquilantes bi-funcionais, sendo que as lesões de DNA produzidas são difíceis de reparar. Exemplos destes são a cisplatina e carboplatina (provavelmente, são atualmente os agentes quimioterapêuticos mais importantes no tratamento de cancro ginecológico) (Sridhar & Symonds, 2009).

A quimioterapia pode ser administrada com intenção paliativa, curativa, em que pode ser curativa em alguns cancros que são extremamente sensíveis (como linfomas), neoadjuvante e adjuvante. A quimioterapia neoadjuvante deve ser administrada antes da cirurgia ou radioterapia em alguns cenários clínicos, com o objetivo de tratar micrometástases não visíveis em imagem convencional, podendo ainda reduzir o tamanho do tumor o que permite a cirurgia ou permitindo que um procedimento

menos radical seja realizado. Já a terapia adjuvante é administrada após cirurgia ou radioterapia primária, agindo como complemento à terapia primária para matar micrometástases (Bhosle & Hall, 2009). A quimioterapia pode também ser administrada em simultâneo com a radioterapia de modo a aumentar o efeito terapêutico (Sridhar & Symonds, 2009).

A quimioterapia pode ser administrada utilizando um único fármaco, ou a combinação de vários fármacos, que pretende melhorar o resultado, maximizando a morte de células tumorais e minimizando o desenvolvimento da resistência aos medicamentos (Bhosle & Hall, 2009).

A toxicidade pelos agentes quimioterapêuticos varia entre os diferentes agentes e mesmo entre diferentes membros da mesma classe (Sridhar & Symonds, 2009). Ainda assim os efeitos secundários típicos a curto prazo da quimioterapia são náuseas, vômitos, fadiga, dificuldades na deglutição, boca seca, alterações no sabor e cheiro, depressão, e ainda alopecia (efeito provocado por alguns agentes anticancerígenos como ciclofosfamida, doxorrubicina e taxanos) e supressão da medula óssea (Sak, 2012; Sridhar & Symonds, 2009). Os efeitos secundários a longo prazo de alguns medicamentos de quimioterapia podem incluir toxicidade cardiovascular (como cardiomiopatia), complicações neurológicas (como disfunção cognitiva), fertilidade, risco de menopausa e ainda toxicidade renal (Tao et al., 2015; Sridhar & Symonds, 2009).

1.3.1.1.1 Cisplatina

A cisplatina, *cis*-Diaminodicloroplatina (II), é um complexo inorgânico formado por um átomo de platina rodeado por átomos de cloro e amónia em posição *cis* de um plano horizontal (Figura 1.1) (Chirino & Pedraza-Chaverri, 2009).

O mecanismo de ação do fármaco cisplatina tem sido associado à sua capacidade de formar complexos com ácidos nucleicos, quando o cloreto se dissocia, deixando um complexo reativo que interage com o DNA (Chirino & Pedraza-Chaverri, 2009). De seguida, a cisplatina forma ligações cruzadas com as bases de purina no DNA, provavelmente entre N7 e O6 das moléculas de guanina adjacentes, resultando em desnaturação local da cadeia de DNA (Dasari & Tchounwou, 2014; Chirino & Pedraza-Chaverri, 2009). Assim os danos do DNA, induzidos por cisplatina, levam à ativação de inúmeras vias de transdução de sinal, e subsequentemente culminam na ativação da apoptose em células cancerígenas (Siddik, 2003). A cisplatina, para além de induzir a morte celular pela apoptose, também induz espécies reativas de oxigénio, que desencadeiam a morte celular além dos danos do DNA (Dasari & Tchounwou, 2014).

A cisplatina exibe atividade clínica contra uma grande variedade de tumores, e é o agente mais ativo no tratamento do cancro do colo do útero. No entanto o perfil de toxicidade deste fármaco limita a sua utilidade clínica, existindo já análogos menos tóxicos, como a carboplatina (Sridhar & Symonds, 2009). Para superar a resistência aos medicamentos e reduzir a toxicidade, foi aplicada a combinação de cisplatina com outros fármacos anticancerígenos, como nova estratégia terapêutica para muitos cancros humanos, como cancro do colo do útero, do ovário, cancro gástrico e carcinomas, como o carcinoma da mama (Dasari & Tchounwou, 2014).

O tratamento com cisplatina tem sido associado a vários efeitos secundários tóxicos, sendo a nefrotoxicidade um dos principais efeitos (Chirino & Pedraza-Chaverri, 2009).

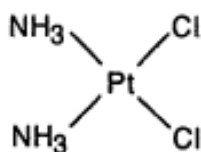


Figura 1.1: Estrutura química da cisplatina (adaptado de Weiss & Christian, 1993).

1.3.1.2 Tratamento com agentes derivados de plantas

Hoje em dia, mais de 60% dos compostos anticancerígenos que são úteis para pacientes com cancro são obtidos a partir de fontes herbárias, marinhas e de microorganismos. As plantas medicinais são importantes para o tratamento do cancro devido aos seus múltiplos compostos químicos, para a descoberta de novos agentes anticancerígenos (Kooti et al., 2017).

É estimado que aproximadamente 50-60% dos pacientes com cancro nos Estados Unidos, utilizam agentes derivados de diferentes partes de plantas ou nutrientes, exclusiva ou concomitantemente com regime terapêutico tradicional (como quimioterapia e/ou radioterapia) (Wang et al., 2012). Vários fitoquímicos de plantas, e não só, melhoram a eficiência de agentes citotóxicos, diminuem a sua resistência e reduzem e aliviam os efeitos secundários tóxicos (Sak, 2012).

Os agentes anticancerígenos derivados de plantas e os seus derivados demonstram ser eficazes para terapia do cancro (Ali et al., 2012). Alguns desses agentes que exibem propriedades anticancerígenas, são por exemplo os polifenóis e os alcaloides de *Catharanthus roseus*. Os polifenóis formam uma das classes mais importantes e amplamente utilizadas de terapêuticos derivados de plantas para a quimioterapia do cancro, sendo exemplos notáveis desses as catequinas de chá verde, a curcumina (polifenol derivado do rizoma da planta *Curcuma longa*), o resveratrol (polifenol primeiramente isolado de raízes de *Veratrum glandiflorum* O.Loos) e a genisteína (Ali et al., 2012; Liu et al., 2009). Estes compostos já demonstraram ser capazes de afetar a eficácia dos agentes quimioterapêuticos tradicionais (Sak, 2012). Outro polifenol é a quercetina, que é capaz de potenciar o efeito citotóxico da cisplatina, enquanto protege células renais normais da toxicidade da cisplatina (Sak, 2012).

Os alcaloides de *Catharanthus roseus*, são uma das classes mais extensamente estudadas de agentes antineoplásicos, como a vimblastina e a vincristina, pois têm propriedades anti-tumorais que derivam da sua interação com a tubulina (componente dos microtúbulos no fuso mitótico). Estes alcaloides em combinação com a quimioterapia, têm sido amplamente utilizados para o tratamento de tumores sólidos (Ali et al., 2012).

Alguns fitoquímicos de plantas do género *Artemisia* também já mostraram promessa como agentes anticancerígenos, como a artemisinina da espécie *Artemisia annua*, e os seus derivados, que exercem efeitos anticancerígenos notáveis nas linhas celulares de uma ampla variedade de tipos de tumores (Efferth et al., 2001).

1.4 *Artemisia absinthium*

A planta *Artemisia absinthium* Linn., do género *Artemisia*, pertence à família Asteraceae, e é um sub-arbusto perene resistente, nativo da Eurásia temperada e da África do Norte (Tobyn et al., 2011). A *Artemisia absinthium* (Figura 1.2) é utilizada em medicinais tradicionais por diversas populações no mundo, sendo também vulgarmente conhecida como *wormwood*, no Reino Unido, *wermut*, na Alemanha, e localmente como Losna, Absinto, Acinto, Sintro, Amargoso, Citronela-maior, Erva-das-sezões, Grande-absinto ou Losna-maior em Portugal (Wright, 2002; Jardim Botânico UTAD, 2017).

As diferentes partes da planta utilizadas para fins medicinais abrangem as folhas, flores, raízes e caule (Nikhat et al., 2013).

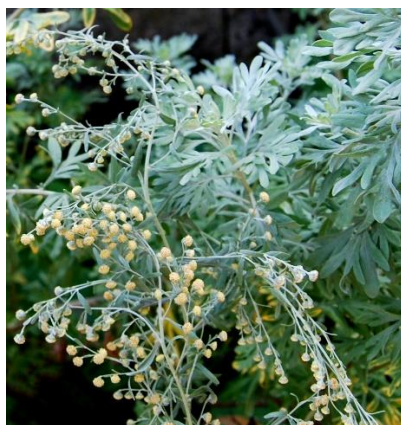


Figura 1.2: *Artemisia absinthium* (adaptado de Jardim Botânico UTAD, 2017).

A. absinthium tem sido usada medicinalmente desde a antiguidade, tendo por exemplo sido mencionada na obra "De Materia Medica" de Dioscórides em que foi descrita como adstringente e que promove a digestão e a urina, sendo ainda um bom agente contra a dor de estômago (Leonti et al., 2009). Esta planta já tinha aparecido anteriormente nas obras de Hipócrates, como planta medicinal que foi aplicada contra a febre (Petrovska, 2012).

Tradicionalmente as folhas secas, flores e o óleo essencial da *A. absinthium* foram usados como anti-helmínticos, antissépticos, antiespasmódicos, sedativos, estimulantes, e para distúrbios digestivos e estomáticos (Wright, 2002). Esta planta é também usada em pequenas quantidades como agente aromatizante em bebidas alcoólicas, como a bebida Absinto, em que neste licor o ingrediente essencial é a *A. absinthium*, que é misturada com a erva-doce, anis e outras ervas (Wright, 2002). Na forma de chá, é consumida principalmente para dores de estômago, contra a falta de apetite, problemas da vesícula biliar, vômitos e diarreia (Nguyen & Németh, 2016).

Os principais compostos biologicamente ativos encontrados em *A. absinthium* incluem flavonoides (como vários flavonol-3-glucósidos que foram isolados a partir de folhas), taninos, glucósidos, carotenoides e componentes fenólicos (Nikhat et al., 2013; Hoffmann & Herrmann, 1982). No entanto no óleo essencial de *A. absinthium*, descrito como neurotóxico, o principal constituinte é a tujona (Wright, 2002).

A planta *A. absinthium* já demonstrou possuir uma série de propriedades, como antipiréticas, antimicrobianas, antifúngicas, diuréticas e anti-inflamatórias (Singh et al., 2012). Os extratos desta espécie possuem ainda outras atividades interessantes, como atividades antimaláricas, anticancerígenas e efeitos hepatoprotetores (Irshad et al., 2011; Shafi et al., 2012; Mohammadian et al., 2016). Além disso, vários extratos da planta, por conterem altos teores de componentes fenólicos e flavonoides, demonstram ainda atividade antiradical e antioxidante (Canadanovic-Brunet et al., 2005).

1.5 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um dos mais numerosos grupos de substâncias no reino vegetal, e são obtidos do metabolismo secundário das plantas (Bravo, 1998). Os compostos fenólicos (ou fenólicos) podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático que contém um ou mais grupos hidroxilo, incluindo os seus derivados funcionais (Shahidi & Naczk, 2003). Surgem biologicamente de duas vias sintéticas principais, a via do ácido chiquímico e a via dos fenilpropanoides (Bravo, 1998).

As frutas, os vegetais e plantas medicinais contêm compostos fenólicos que incluem por exemplo os ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanas, estilbenos e taninos (Cai et

al., 2004). No entanto destes compostos, os flavonoides, os ácidos fenólicos e taninos são considerados os três grupos mais importantes de fenólicos alimentares (King & Young, 1999).

Os compostos fenólicos são de considerável importância fisiológica e morfológica em plantas, pois desempenham um papel importante no crescimento e reprodução, proporcionando proteção contra patogênicos e predadores, além de contribuírem para a cor e as características sensoriais de frutas e legumes (Balasundram et al., 2006). A presença de compostos fenólicos em alimentos vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais (Bravo, 1998).

Os compostos fenólicos das plantas são uma parte essencial da dieta humana, e são de interesse considerável devido às suas propriedades antioxidantes (Balasundram et al., 2006). Um composto antioxidante é uma molécula capaz de inibir a oxidação de outras moléculas, sendo que em termos de alimentos, um antioxidante foi definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com a de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação desse substrato (Gülçin, 2012).

1.5.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são uma classe importante de compostos fenólicos, que ocorrem amplamente no reino vegetal (Cai et al., 2004). Estes compostos caracterizam-se por possuírem um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo na molécula (Soares, 2002).

Os ácidos fenólicos consistem em dois subgrupos, isto é, os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos têm em comum a estrutura C₆-C₁, e incluem o ácido gálico, o ácido *p*-hidroxibenzóico, o ácido protocatecuico, o ácido vanílico e sirínico. Por outro lado, os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos (C₆-C₃), sendo os mais comuns o ácido cafeico, o ácido ferúlico, e os ácidos *p*-cumárico e sináptico (Balasundram et al., 2006). Os ácidos protocatecuico e vanílico, e os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, são ácidos presentes em quase todas as plantas (Robbins, 2003).

Os ácidos fenólicos, podem ligar-se entre si ou a outros compostos, sendo a combinação mais importante destes ácidos a do ácido cafeico associado ao ácido quínico, que origina o ácido clorogénico (Soares, 2002). O ácido clorogénico (Figura 1.3) é amplamente distribuído em frutas e vegetais, mas é notável por as suas altas concentrações em sementes (King & Young, 1999).

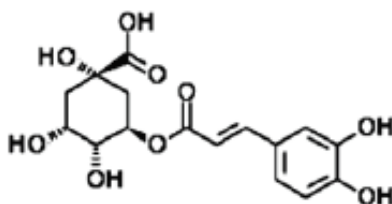


Figura 1.3: Estrutura química do ácido clorogénico (adaptado de Falé, 2011).

Os ácidos hidroxibenzóicos, tanto livres como esterificados, são encontrados em apenas algumas plantas consumidas pelo Humano, sendo os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns do que os ácidos hidroxibenzóicos (Manach et al., 2004).

Os compostos ácidos fenólicos têm sido relatados como tendo propriedades biológicas e farmacológicas importantes e podem ter benefícios para a saúde humana. São importantes componentes da dieta humana, devido à sua potencial atividade antioxidante e às suas atividades anticancerígenas

potencialmente importantes. A atividade antioxidante das plantas proveniente do teor de ácidos fenólicos, é devida especialmente ao ácido cafeico e *p*-cumárico (Goleniowski et al., 2013).

1.5.2 Flavonoides

Os flavonoides são compostos polifenólicos que ocorrem de forma ubíqua em alimentos de origem vegetal, sendo as frutas e vegetais as principais fontes de flavonoides para a dieta Humana, juntamente com o chá e o vinho (Hollman & Katan, 1999; Kumar & Pandey, 2013). Os flavonoides são a maior classe de polifenóis, com uma estrutura comum de difenilpropanos ($C_6-C_3-C_6$), consistindo em dois anéis aromáticos A e B ligados através de uma ponte de três carbonos, geralmente na forma de um anel heterocíclico C (Figura 1.4) (Ross & Kasum, 2002; Balasundram et al., 2006). Estes são compostos de baixo peso molecular (Balasundram et al., 2006).

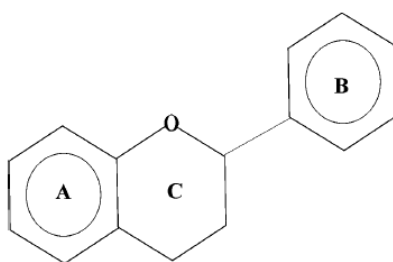


Figura 1.4: Estrutura básica de um flavonoide (adaptado de Ross & Kasum, 2002).

Os flavonoides podem subdividir-se em seis principais subclasses, com base em variações no anel heterocíclico (C), que incluem as flavonas (como a apigenina e a luteolina), os flavonóis (como a quercetina e miricetina), as flavanonas (como a naringenina e hesperidina), flavanóis ou catequinas (por exemplo a epicatequina e galocatequina), as antocianidinas (por exemplo a cianidina e pelargonidina) e as isoflavonas (como a genisteína e daidzeína) (Ross & Kasum, 2002). A maioria dos flavonoides presentes nas plantas estão ligados a glucósidos, embora ocasionalmente eles sejam encontrados como agliconas (Ross & Kasum, 2002). De entre os flavonoides, as flavonas, os flavonóis e os seus glucósidos são os compostos mais comuns (Bravo, 1998). O chá, por exemplo, é uma das principais fontes dietéticas de flavonóis e flavonas, que contém quantidades notáveis de quercetina e de kaempferol (Ross & Kasum, 2002).

Os diferentes flavonoides para além de contribuírem para a coloração da maioria das flores, frutas e sementes, têm diversas funções biológicas, que incluem a proteção contra a radiação ultravioleta e agentes patogénicos (Ferreira et al., 2012).

Muitos flavonoides apresentam atividades hepatoprotetoras, anti-inflamatórias e anticancerígenas, prevenção de doenças cardíacas coronárias, no entanto a melhor propriedade descrita de quase todos os grupos de flavonoides é a sua atividade antioxidante (Kumar & Pandey, 2013).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Este trabalho tem como principal objetivo, avaliar o efeito *in vitro* da decocção, de folhas e caules secos, da planta *Artemisia absinthium* obtida comercialmente, a nível celular, em linhas celulares humanas, e o efeito destes extratos vegetais em conjunto com fármacos de quimioterapia do cancro.

Assim teve-se como objetivos específicos:

- 1) Analisar a composição química do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium*, e determinar os compostos bioativos presentes;
- 2) Avaliar o metabolismo *in vitro* da decocção de *A. absinthium*;
- 3) Avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium*;
- 4) Determinar a citotoxicidade do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium*, em linhas celulares cancerígenas humanas;
- 5) Analisar o efeito do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* na composição bioquímica de linhas celulares cancerígenas humanas;
- 6) Avaliar o efeito do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* em simultâneo com um fármaco de quimioterapia, numa linha celular tumoral humana.

CAPÍTULO III

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

3.1.1 Material vegetal

A planta *Artemisia absinthium*, vulgarmente conhecida por Losna, utilizada neste trabalho foi adquirida num estabelecimento comercial local, sendo da marca Diética® e usada na preparação de infusões. Foram utilizadas no trabalho as folhas e os caules secos desta planta.

3.1.2 Reagentes

O meio de cultura RPMI 1640, a L-glutamina, Pen-Strep (mistura de penicilina e estreptomicina), o FBS (soro fetal bovino) e a tripsina utilizados em cultura das linhas celulares, foram adquiridos à Lonza® (Verviers, Bélgica). O Azul de Coomassie R-250 foi adquirido à Bio-RAD®. Os reagentes ácido clorogénico, cinarina, pancreatina (isolada de pâncreas de porco), cisplatina, H₂O₂ (peróxido de hidrogénio) 30%, IGEPAL, glicina, persulfato de amónio, SDS (dodecilsulfato de sódio), acetona e azul de tripano foram adquiridos à Sigma-Aldrich® (Barcelona, Espanha). O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi adquirido à Alfa Aesar®. A pepsina, DTT (ditiotreitól) e KCl (cloreto de potássio), foram comprados à Fluka®. Os reagentes NaCl (cloreto de sódio), KH₂PO₄ (dihidrogenofosfato de potássio), K₂HPO₄ (hidrogenofosfato de di-potássio), Tris (Tris(hidroximetil)aminometano), Na₂HPO₄ (hidrogenofosfato dissódico), ácido trifluoracético, ácido acético glacial e 2-propanol foram adquiridos à Merck® (Darmstadt, Alemanha). O reagente acetonitrilo foi comprado à CARLO ERBA Reagents®. O reagente HCl (ácido clorídrico) foi adquirido à Panreac®. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) e o TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina) foram adquiridos à VWR Chemicals®. Os reagentes ureia e acrilamida/bisacrilamida 29:1 foram adquiridos à Amresco®. O marcador de proteínas e tampão de amostra (5x SDS-PAGE) foram da NZYTech®. Os reagentes utilizados nas análises de HPLC-DAD como o ácido fórmico e metanol (HiPerSolv CHROMANORM gradient for HPLC grade LC-MS) foram adquiridos da VWR Chemicals®. A água Milli-Q usada foi ultra purificada num sistema Milli-Q da Millipore.

3.1.3 Cultura de linhas celulares

Para o trabalho foram utilizadas as linhas celulares humanas HeLa (ATCC#CCL-2), derivada do epitélio do adenocarcinoma cervical, MCF-7 (ATCC#HTB-22), derivada do epitélio do adenocarcinoma da mama e Caco-2 (ATCC#HTB-37), derivada do epitélio do adenocarcinoma colo-rectal, adquiridas à ATCC®.

Todos os procedimentos realizados com as linhas celulares foram desenvolvidos em condições de esterilidade numa câmara de fluxo laminar de segurança biológica classe II (Esco® Class II Biohazard Safety Cabinet modelo 4522). Para as linhas celulares HeLa, MCF-7 e Caco-2 a rotina da subcultura consistiu em tripsinizar as culturas em subconfluência (70-80%) e semear em 2x10⁴ células/cm² em frascos de cultura de células de 25 cm² em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina, a 37°C numa incubadora O₂/CO₂ e com uma atmosfera a 5% de CO₂ (SANYO, modelo MCO-19M). As células HeLa e MCF-7 foram passadas a cada 48 a 72 horas, enquanto o meio das células Caco-2 foi mudado a

cada 48 a 72 horas, e as células foram passadas antes de atingir a confluência. O crescimento das linhas celulares foi acompanhado por microscópio ótico invertido (Motic AE21).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação do extrato aquoso de *Artemisia absinthium*

O extrato aquoso da planta *A. absinthium* usado no trabalho, foi preparado com as folhas e caules secos desta planta, que foram previamente pesados, obtendo-se 47 g de material vegetal que foi utilizado para preparar uma decocção. Esta foi realizada numa proporção de 10 g de material vegetal em 100 mL de água destilada deixando-se ferver durante 5 minutos. De seguida a decocção da planta foi filtrada por filtro *Whatman* nº1. A amostra de extrato foi congelada e liofilizada num liofilizador *Heto Power Dry* LL 3000, obtendo-se um rendimento de extração de 104,04 mg extrato/g planta. A amostra ficou armazenada num congelador para uma avaliação posterior.

3.2.2 Análise do extrato aquoso por HPLC-DAD

A composição do extrato aquoso de *A. absinthium* foi analisada por HPLC-DAD e a quantificação de ácidos fenólicos foi realizada num sistema de cromatografia líquida *Finnigan™ Surveyor Plus Thermo Scientific* com uma coluna *LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18* (5 µm) da Merck. O extrato aquoso da planta foi analisado por HPLC de acordo com Nunes et al. (2014) com algumas modificações. Resumidamente, injetou-se 25 µL de solução de extrato (1 mg/mL) com um injetor automático, e usou-se um gradiente de eluição composto por solução A (ácido fórmico a 0,05%) e solução B (metanol) como se segue: 0 min, 80% de A, 20% de B; 20 min, 20% de A, 80% de B; 25 min, 20% de A, 80% de B, com um fluxo de 1,000 mL/min. A deteção foi realizada entre 200 e 600 nm com um detetor do tipo DAD (Detetor de matriz de díodos). O *software* utilizado para adquirir e processar os dados foi o *Xcalibur™* da *Thermo Scientific*. De modo a estimar concentrações de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso da planta em questão, foi realizada uma curva de calibração com as áreas dos picos para o padrão ácido clorogénico e para o padrão cinarina, variando a concentração de 1 a 100 µM e 10 a 100 µg/mL, respetivamente. Assim estes padrões foram analisados por HPLC-DAD utilizando as mesmas condições acima descritas.

3.2.3 Análise do extrato aquoso por LC-MSⁿ

A análise do extrato aquoso da planta *A. absinthium* foi efetuada por LC-MSⁿ num HPLC *Dionex Ultimate 3000* composto por uma bomba binária *HPG3200*, um amostrador automático *WPS300* e um forno de coluna *TCC3000*, acoplado a um espectrómetro de massa *ion trap LCQ Fleet*, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) da *Thermo Scientific™*, com uma coluna *Kinetex C18 100 A* (150 mm x 4,60 mm, 5 µm, *Phenomenex*), operado em modo de ionização negativo. Resumidamente o extrato aquoso da planta foi analisado por injeção de 10 µL de solução de extrato (1 mg/mL) com um injetor automático, e usou-se um gradiente de eluição composto por solução A (ácido fórmico a 0,1%) e solução B (acetonitrilo) como se segue: 0 min, 95% de A, 5% de B; 30 min, 30% de A, 70% de B; 32 min, 0% de A, 100% de B; 40 min, 0% de A, 100% de B; 45 min, 95% de A, 5% de B, com um fluxo de 0,350 mL/min. Os parâmetros operacionais otimizados foram: voltagem de

pulverização: +4,5 kV; voltagem capilar: -16 V; deslocamento das lentes do tubo: 120 V; temperatura capilar: 250°C; Gás de revestimento (N₂) a uma taxa de fluxo de 10 unidades arbitrárias. Os espectros de massa foram registados no intervalo de 100 a 1000 Da e geralmente correspondem à média de 20-35 *scans*. Os espectros de massa em *tandem* foram obtidos com uma janela de isolamento de 2,0 Da, energia de colisão de 25-27 V e um tempo de excitação de 30 ms. O *software* utilizado para adquirir e processar os dados foi o Xcalibur™ da *Thermo Scientific*.

3.2.4 Ensaios de metabolismo *in vitro* do extrato aquoso por suco gástrico e suco pancreático artificiais

3.2.4.1 Digestão gástrica do extrato de *A. absinthium in vitro*

O ensaio de digestão gástrica foi realizado utilizando suco gástrico artificial em contacto com extrato aquoso como descrito em Porfírio et al. (2010), com algumas alterações. A solução de suco gástrico consistiu em 3,2 mg/mL de pepsina em 2 mg/mL de NaCl a pH = 1,2. Juntou-se 750 µL de solução de extrato 4 mg/mL em água e 750 µL de suco gástrico num *eppendorf* e incubou-se a mistura reacional a 37°C num banho termostaticado durante 4 horas (concentração final de extrato 2 mg/mL). Posteriormente recolheu-se amostras de 500 µL da mistura reacional no tempo 0 horas e 4 horas para um *eppendorf* contendo 500 µL de metanol gelado (agitou-se a mistura reacional antes de recolher). Guardou-se os *eppendorfs* no congelador e no final centrifugou-se durante 5 minutos a 5000g numa centrífuga Mini Spin VWR Galaxy 7D (concentração final de extrato 1 mg/mL). Os ensaios foram realizados em triplicado, e por cada ensaio fez-se um controlo com extrato e água em vez de suco gástrico e um controlo com suco gástrico e água sem extrato.

Por fim os sobrenadantes foram recolhidos em *vials* de HPLC e analisados por HPLC-DAD utilizando as mesmas condições usadas na secção 3.2.2.

3.2.4.2 Digestão pancreática do extrato de *A. absinthium in vitro*

O ensaio de digestão pancreática foi realizado utilizando suco pancreático artificial em contacto com extrato aquoso como descrito Porfírio et al. (2010), com algumas alterações. A solução de suco pancreático consistiu em 25 mg/mL de pancreatina em tampão fosfato de potássio 50 mM a pH = 8. Os ensaios foram realizados como descrito anteriormente para a digestão gástrica na secção 3.2.4.1, mas utilizando suco pancreático.

3.2.5 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* do extrato de *A. absinthium* foi determinada de acordo com o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) descrito por Falé et al. (2013), com algumas modificações.

Para determinar a atividade antioxidante do extrato utilizou-se uma solução de DPPH em que se adicionou 1 mg de DPPH em 50 mL de metanol e deve apresentar uma absorvância de 0,700. Preparou-se amostras com uma gama de concentrações de extrato de 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL que foram utilizadas para os ensaios, adicionando-se 10 µL de solução de extrato a 1 mL de solução de DPPH, em *cuvettes* de plástico. Após um período de incubação da mistura durante 30 minutos a temperatura ambiente, as medições espectrofotométricas foram realizadas a 517 nm utilizando um

espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, contra um branco contendo 10 µL de solução extrato e 1 mL de metanol em vez da solução de DPPH. Realizou-se também um ensaio como controlo em que se adicionou 10 µL água destilada em substituição de extrato a 1 mL de solução de DPPH, e se leu a absorvância contra um branco contendo 10 µL de água destilada e 1 mL de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Para calcular a atividade antioxidante usou-se a seguinte expressão:

$$AA (\%) = 100 \times [(A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{controlo}}]$$

Em que *AA* corresponde à atividade antioxidante, A_{controlo} corresponde à absorvância do controlo da solução de DPPH, A_{amostra} à absorvância da amostra de extrato.

Por fim recorreu-se à análise da regressão linear, com a atividade antioxidante em função das várias concentrações de extrato, de modo a obter a concentração de extrato da planta correspondente a 50% de atividade antioxidante (EC_{50}).

3.2.6 Determinação da citotoxicidade em linhas celulares

3.2.6.1 Determinação da citotoxicidade do extrato aquoso de *A. absinthium* em HeLa, MCF-7 e Caco-2

Os estudos de citotoxicidade nas linhas celulares foram realizados utilizando o teste de viabilidade do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações.

O teste de viabilidade foi realizado com células HeLa, MCF-7 e Caco-2, após estas serem tripsinizadas. Semearam-se 5,000 células/poço HeLa e 6,000 células/poço MCF-7 e Caco-2, em 100 µL de uma suspensão de células em meio RPMI 1640 suplementado, em placas estéreis de 96 poços e incubaram-se durante 48 horas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂. Após o período de incubação (atingida a aderência e confluência das células) o meio de cultura foi substituído por 100 µL de soluções de concentrações crescentes de extrato da planta diluídas em novo meio RPMI 1640 suplementado (0,5; 1; 2; 4; 5 mg/mL de meio para HeLa; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 mg/mL de meio para MCF-7 e Caco-2), e as placas foram novamente incubadas durante 48 horas nas mesmas condições acima referidas. Em relação ao ensaio do controlo a substituição do meio de cultura fez-se por 100 µL de apenas novo meio de cultura RPMI 1640 suplementado.

De seguida substituíram-se as soluções por 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em meio de cultura RPMI 1640 suplementado, e reincubou-se durante 2 horas nas células HeLa e 3 horas nas MCF-7 e Caco-2. Por fim substituiu-se o meio por 200 µL de metanol e ressuspendeu-se, lendo-se de seguida a absorvância da placa num espectrofotómetro leitor de microplacas Tecan Sunrise A-5082 a 595 nm com referência a 630 nm com o *software* RdrOle v. 4.30 e analisou-se a viabilidade das células, uma vez que a absorvância lida é proporcional ao número de células viáveis. Foram realizados 8×2 ensaios para cada concentração de extrato aquoso testada, bem como para o controlo.

Para calcular a viabilidade (expressa em percentagem) das linhas celulares em questão, através dos valores de absorvância obtidos, usou-se a seguinte expressão:

$$\% \text{ viabilidade} = (A_{\text{extrato}} \times 100)/A_{\text{controlo}}$$

Em que *% viabilidade* corresponde à percentagem de viabilidade de células tratadas com várias concentrações de extrato aquoso, A_{extrato} corresponde à absorvância de células tratadas com várias

concentrações de extrato, A_{controlo} à média (de 6×2 ensaios) da absorvância do controlo de células sem tratamento (apenas com meio de cultura). Os valores de viabilidade celular foram obtidos para 6×2 ensaios de cada concentração de extrato aquoso testada.

De modo a obter a concentração de extrato da planta que provoca uma diminuição de 50% da viabilidade celular (IC_{50}), recorreu-se à análise da regressão linear, com a viabilidade celular em função das várias concentrações de extrato.

3.2.6.2 Determinação da citotoxicidade de compostos padrão em HeLa

Realizaram-se ainda estudos de citotoxicidade mais aprofundados na linha celular HeLa, utilizando também o teste de viabilidade do MTT como descrito anteriormente para a citotoxicidade do extrato aquoso da planta em estudo (secção 3.2.6.1). No entanto foram testados outros compostos, que podem funcionar como controlos e ainda um fármaco usado na quimioterapia do cancro, a cisplatina.

As células HeLa foram tripsinizadas, semeadas em placas estéreis de 96 poços e incubadas durante 48 horas a 37°C, como descrito na secção 3.2.6.1. De seguida o meio de cultura foi substituído por 100 µL de soluções de concentrações crescentes dos compostos testados diluídas em novo meio RPMI 1640 suplementado, como: soluções do padrão ácido clorogénico a 5; 10,2; 20; 44 e 50 µM em meio; soluções de cisplatina a 1; 3; 4; 5 e 6 µM em meio, de acordo com Tardito et al. (2009), tendo sido anteriormente preparada uma solução *sotck* de cisplatina, em água, de 2 mg/mL incubada cerca de 96 horas para hidrólise completa, a usar nos ensaios; soluções de cisplatina a 1; 3; 4; 5 e 6 µM em meio juntamente com extrato aquoso da planta a 0,40 mg/mL de meio; soluções de cisplatina a 1; 3; 4; 5 e 6 µM em meio juntamente com o padrão ácido clorogénico a 50 µM em meio; soluções de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a 20; 40; 60; 80 e 100 µM em meio, de acordo com Park (2014); soluções de H_2O_2 a 20; 40; 60; 80 e 100 µM em meio juntamente com extrato aquoso da planta a uma concentração fixa de 0,40 mg/mL de meio; soluções de H_2O_2 a 20; 40; 60; 80 e 100 µM em meio juntamente com o padrão ácido clorogénico a 50 µM em meio. Em relação aos ensaios do controlo para os estudos realizados apenas com um composto (padrão ácido clorogénico, cisplatina ou H_2O_2), a substituição do meio de cultura fez-se por 100 µL de apenas novo meio de cultura RPMI 1640 suplementado. Por outro lado, para estudos feitos com a junção dos compostos cisplatina ou H_2O_2 com extrato, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de solução de extrato aquoso a 0,40 mg/mL de meio, e para estudos feitos com a junção dos compostos cisplatina ou H_2O_2 com ácido clorogénico, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de solução do padrão ácido clorogénico a 50 µM em meio. As placas foram novamente incubadas durante 48 horas nas mesmas condições referidas na secção 3.2.6.1, assim como todo o restante procedimento e ainda o cálculo da viabilidade celular e do valor de IC_{50} .

3.2.7 Análise de alterações a nível celular por espectroscopia de FTIR

3.2.7.1 Análise de alterações nas linhas celulares HeLa e MCF-7 provocadas pelo extrato aquoso de *A. absinthium* através de espectroscopia de FTIR

Espectroscopia de FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier) foi utilizada para detetar alterações bioquímicas de materiais biológicos em células e deste modo comparar células incubadas com extrato aquoso da planta *A. absinthium* com células controlo, utilizando um espectrómetro Nicolet 6700 FT-IR produzido pela *Thermo electron corporation* e equipado com um detetor de Sulfato de triglicina deuterada (DTGS TEC). Os parâmetros experimentais foram ajustados da seguinte forma: experiência em modo de Transmissão com resultados apresentados em absorvância,

região de *scan* de 4000-900 cm^{-1} , números de *scans* de 128, resolução dos espectros a 4 cm^{-1} , sendo que o *software* utilizado para adquirir os dados foi o OMNIC™ da *Thermo Scientific*.

As alterações de materiais biológicos nas linhas celulares HeLa e MCF-7 foram analisadas após estas serem tripsinizadas. As células foram semeadas em placas de 12 poços nos quais foram colocadas janelas de transmissão de fluoreto de cálcio (CaF_2) idênticas, cujas dimensões foram de 15 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Semearam-se assim aproximadamente 700 000 células/janela HeLa e 700 000 células/janela MCF-7, em 2 mL de uma suspensão de células em meio RPMI 1640 suplementado, suavemente sobre cada uma das janelas de CaF_2 , e as células HeLa e MCF-7 foram incubadas durante 24 horas e 48 horas, respetivamente, a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2 .

Após o período de incubação verificou-se a fixação das células usando um microscópio ótico invertido e para ensaios sobre a resposta das células ao extrato aquoso de *A. absinthium* substituiu-se o meio de cultura por 2,5 mL de solução de extrato aquoso (0,40 mg/mL de meio de cultura para HeLa; 0,35 mg/mL de meio para MCF-7) aplicada na superfície das janelas de CaF_2 . Foi também realizado um ensaio controlo em que a substituição do meio de cultura fez-se por apenas 2,5 mL de meio de cultura RPMI novo aplicado numa das janelas. As células foram novamente incubadas durante 48 horas nas mesmas condições anteriormente referidas.

Seguidamente retirou-se as soluções dos poços das placas, lavou-se as janelas de CaF_2 com água destilada e evaporou-se até à secura sob um fluxo de azoto. As janelas foram ainda submetidas a liofilização durante 1 hora, de modo a maximizar a secagem. Por fim as janelas foram montadas num suporte e a análise realizada no espectrómetro com as condições acima referidas, registando-se três medições para cada ensaio, obtendo-se assim três espetros infravermelho para cada ensaio. Executou-se um espectro *background*, usando uma janela de CaF_2 sem amostra, para analisar a intensidade da radiação infravermelho sem amostra.

Para calcular a altura das bandas principais obtidas nos espectros de infravermelho de todos os ensaios subtraiu-se o valor de absorvância mínimo da banda ao valor de absorvância máximo desta. Os números de onda (cm^{-1}) correspondentes aos valores de absorvância máximo e mínimo reais das bandas foram obtidos para um dos ensaios controlo (células sem tratamento, crescidas em meio de cultura) das linhas celulares em estudo, sendo que os valores de absorvância máximo e mínimo para os restantes ensaios foram considerados aos mesmos números de onda. Por fim calcularam-se diferentes razões com os valores das alturas das bandas entre as diferentes bandas, obtendo-se estas razões para as três medições de cada ensaio. A linha de base dos espectros obtidos foi normalizada para a altura da Amida II, antes do cálculo das alturas das bandas.

Foram ainda realizados ensaios controlo na ausência de células com apenas as amostras usadas no estudo, soluções de extrato aquoso da planta, posteriormente dissolvidas num solvente adequado. Assim sendo foram aplicados 25 μL de 2-propanol e 25 μL de solução de extrato (concentração final de 0,40 mg/mL) na superfície de uma janela de CaF_2 e 22 μL de 2-propanol e 22 μL de solução de extrato (concentração final de 0,35 mg/mL) numa outra janela de CaF_2 , que em seguida foram evaporados até à secura sob um fluxo de azoto, formando assim um filme nas janelas a ser analisado.

3.2.7.2 Análise de alterações na linha celular HeLa provocadas por compostos padrão através de espectroscopia de FTIR

Realizaram-se ainda análises por espectroscopia de FTIR mais aprofundadas na linha celular HeLa de modo a detetar alterações de materiais biológicos nestas células quando incubadas com diferentes compostos comparativamente com células controlo, como descrito anteriormente na secção 3.2.7.1. As análises foram realizadas no mesmo equipamento e nas mesmas condições descritas na

secção 3.2.7.1 e foram testados vários compostos nas células que também já tinham sido testados nos estudos de citotoxicidade (secção 3.2.6.2), como o ácido clorogénico e o fármaco cisplatina.

Assim sendo as alterações nas células HeLa foram analisadas após estas serem tripsinizadas, semeadas em placas de 12 poços nos quais foram colocadas as janelas de CaF₂, e incubadas durante 24 horas a 37°C, como descrito na secção 3.2.7.1. Após o período de incubação substituiu-se o meio de cultura por 2,5 mL de solução de cada composto testado (diluída em novo meio RPMI 1640 suplementado), como: solução do padrão ácido clorogénico a 50 µM em meio de cultura; solução de cisplatina a 2,98 µM em meio; solução de cisplatina a 0,92 µM em meio juntamente com extrato aquoso da planta a 0,40 mg/mL de meio; solução de cisplatina a 3,77 µM em meio juntamente com o padrão ácido clorogénico a 50 µM em meio; solução de H₂O₂ a 31,88 µM em meio; solução de H₂O₂ a 8,46 µM em meio juntamente com extrato aquoso da planta a 0,40 mg/mL de meio; solução de H₂O₂ a 31,26 µM em meio juntamente com o padrão ácido clorogénico a 50 µM em meio. Estas soluções foram aplicadas devidamente na superfície das janelas de CaF₂. Foram também realizados ensaios controlos, em que a substituição do meio de cultura fez-se por apenas 2,5 mL de meio de cultura RPMI novo aplicado numa das janelas. As células foram novamente incubadas durante 48 horas nas mesmas condições referidas na secção anterior (3.2.7.1), tal como o restante procedimento e ainda o cálculo da altura das bandas principais dos espectros obtidos. O espectro de vapor de água foi subtraído aos espectros obtidos quando necessário.

Foram também realizados ensaios controlo na ausência de células com apenas as amostras usadas em estudo, como solução de ácido clorogénico e cisplatina. Desta forma foram aplicados 50 µL de 2-propanol e 8,9 µL de solução de ácido clorogénico (concentração final de 50 µM) na superfície de uma janela de CaF₂, e 25 µL de 2-propanol e 25 µL de solução de cisplatina (concentração final de 2,98 µM) numa outra janela de CaF₂, que em seguida foram evaporados até à secura sob um fluxo de azoto.

3.2.8 Análise Eletroforética SDS-PAGE de proteínas após exposição das linhas celulares HeLa e MCF-7 ao extrato aquoso de *A. absinthium*

O estudo da influência do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* na expressão de proteínas no citosol das linhas celulares HeLa e MCF-7 foi realizado através de eletroforese unidimensional SDS-PAGE (do português, eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) que permite caracterizar misturas complexas de proteínas e separá-las.

As amostras a usar no estudo e a aplicar nos géis foram preparadas previamente à eletroforese. As células HeLa e MCF-7 após serem tripsinizadas foram semeadas em 2x10⁴ células/cm² em novos frascos de cultura de células de 25 cm² em meio de cultura RPMI 1640 suplementado e colocadas a crescer 72 horas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂.

Após o período de crescimento das linhas celulares nos frascos de cultura de 25 cm² o meio de cultura foi substituído por 6 mL de solução de extrato da planta diluída em novo meio RPMI 1640 suplementado (0,40 mg/mL em meio para HeLa; 0,35 mg/mL em meio para MCF-7) e as células foram novamente incubadas durante 48 horas nas mesmas condições acima referidas. Relativamente às células controlo houve apenas substituição do meio de cultura por novo meio. O estudo foi realizado em duplicado para a concentração de extrato aquoso testada para ambas as linhas celulares, bem como para o controlo das células MCF-7, sendo que nas HeLa realizou-se apenas um replicado controlo.

Posteriormente retirou-se as soluções dos frascos de cultura (bem como o meio de cultura nos frascos dos controlos) e tripsinizou-se as células, ficando-se com 4,28×10⁶ células nos frascos de cultura de 25 cm² do extrato e 5,79×10⁶ células no frasco do controlo no caso das células HeLa, e ficando 1,50×10⁶ células nos frascos de cultura do extrato e 2,04×10⁶ células nos frascos do controlo no caso das células MCF-7. Imediatamente a seguir juntou-se 200 µL de tampão PBS diluído 1x (estéril) às células

e transferiu-se as suspensões para *ependorfs* estéreis colocando-os de seguida em gelo fora da câmara de fluxo laminar de segurança biológica classe II. As suspensões de células foram centrifugadas a 500g durante 1 minuto numa centrífuga *Eppendorf* (modelo 5415 D) e os sobrenadantes foram descartados, adicionando-se 500 µL de tampão PBS 1x aos precipitados. As células foram novamente a centrifugar nas mesmas condições anteriormente referidas. Os sobrenadantes resultantes foram descartados, juntou-se 100 µL de tampão de lise (80 µL IGEPAL, 20 mg DTT, 681 mg ureia e aproximadamente 1920 µL água) aos precipitados e as amostras foram sonificadas e centrifugadas a -4°C a 10 000g durante 10 minutos de modo a romper as células. Os sobrenadantes resultantes (aproximadamente 100 µL) foram usados para precipitação das proteínas existentes do citosol das células controlo e tratadas com extrato, com três volumes de acetona *overnight* a 8°C. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições a cima referidas e descartaram-se os sobrenadantes acetona, guardando-se apenas os “precipitados de proteína”.

As amostras em estudo foram ainda preparadas para aplicar nos poços dos géis. Os “precipitados de proteína” do citosol das células controlo e extrato (tratadas com extrato) HeLa e MCF-7 foram dissolvidos em 45 µL de tampão de aplicação de amostra (contendo azul de bromofenol) e água numa proporção de 1/5. Estas amostras foram sonificadas e recolheu-se para novos *ependorfs* 20 µL de amostras controlo e 25 µL de amostras extrato (das células tratadas com extrato), que foram diluídas novamente em tampão de amostra e água numa proporção de 1/5. Foram aplicados nos géis 20 µL das amostras de “proteínas controlo” e 25 µL das amostras de “proteínas de extrato” que correspondem a uma concentração de proteínas provenientes do citosol de aproximadamente o mesmo número de células de controlo e extrato ($5,6 \times 10^4$ células HeLa; $5,3 \times 10^4$ células MCF-7).

As soluções para os géis de concentração e resolução foram preparadas, sendo que no gel de concentração usou-se uma percentagem de 4% de acrilamida/bisacrilamida e para o gel de resolução usou-se uma percentagem de 10%. Após a polimerização dos géis e a montagem da câmara de eletroforese foram aplicadas as amostras anteriormente referidas nos poços dos géis e ainda 5 µL de marcador de proteína num dos poços.

A corrida eletroforética decorreu com uma voltagem de 100 V durante aproximadamente 3 horas (até o azul de bromofenol atingir o fim do gel de resolução) com tampão de eletroforese Tris-glicina + 0,1% SDS a pH = 8,3 (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM e 0,1% (m/v) SDS). No final da corrida o gel foi revelado utilizando-se uma solução corante com azul de Coomassie (contendo uma solução aquosa de azul de Coomassie R-250 40%, metanol 50% e ácido acético glacial 10%) durante 1 hora e agitando ocasionalmente. Posteriormente colocou-se o gel numa solução descorante (contendo ácido acético glacial 10%, metanol 40% e água destilada 50%) durante 30 minutos, sendo esta substituída por nova solução descorante *overnight*. O gel foi fotografado num sistema ImageQuant LAS 500 da *GE Healthcare Life Sciences*TM e as imagens dos géis tratadas no programa *ImageJ*.

3.2.9 Análise do perfil proteico das linhas celulares HeLa e MCF-7 após exposição ao extrato aquoso de *A. absinthium*, por HPLC-DAD

Para suportar os dados obtidos através da eletroforese SDS-PAGE realizou-se ainda uma análise da influência do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* no perfil proteico do citosol das linhas celulares HeLa e MCF-7 por HPLC-DAD.

As amostras a usar para posterior análise por HPLC-DAD foram preparadas previamente e de acordo com o mesmo procedimento descrito em 3.2.8 – “Análise Eletroforética SDS-PAGE de proteínas após exposição das linhas celulares HeLa e MCF-7 ao extrato aquoso de *A. absinthium*”. Assim sendo após a precipitação de proteínas existentes do citosol das células HeLa e MCF-7 controlo e tratadas com extrato e posterior centrifugação, obteve-se as amostras de sobrenadantes acetona e as amostras dos

precipitados de proteína do citosol das células HeLa e MCF-7 controlo e extrato (tratadas com extrato). Foi realizado apenas um replicado para a concentração de extrato aquoso testada para ambas as linhas celulares, bem como para os controlos.

3.2.9.1 Análise de proteínas do citosol de células HeLa e MCF-7 controlo e expostas a extrato de *A. absinthium*, por HPLC-DAD

A análise por HPLC-DAD foi realizada num sistema de cromatografia líquida Elite LaChrom® VWR Hitachi equipado com uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 60 RP-select B (5µm) da Merck, e um forno de coluna L-2300. As amostras em estudo foram analisadas por HPLC utilizando a composição do gradiente de acordo com Serralheiro & Cabral (1999), com algumas modificações. Resumidamente, injetou-se 25 µL das soluções de amostra com um injetor automático, e usou-se um gradiente de eluição composto por solução A (ácido trifluoracético a 0,05%) e solução B (acetonitrilo a 80% e ácido trifluoracético a 0,05%) como se segue: 0 min, 75% de A, 25% de B; 15 min, 2% de A, 98% de B; 20 min, 2% de A, 98% de B; 25 min, 75% de A, 25% de B; 30 min, 75% de A, 25% de B com um fluxo de 1,000 mL/min. A deteção foi realizada entre 200 e 600 nm com um detetor do tipo DAD (Detetor de matriz de díodos) L-2455. O *software* utilizado para adquirir os dados foi o EZChrom Elite® da Agilent Technologies.

As amostras, referidas anteriormente na secção 3.2.9, a analisar foram ainda preparadas para injeção no HPLC. Deste modo os sobrenadantes acetona tanto das amostras controlo como extrato de ambas as linhas celulares foram secos sob um fluxo de azoto para evaporar a acetona, restando aproximadamente 100 µL de amostras de “sobrenadante acetona”. No caso das células MCF-7, estas amostras foram imediatamente recolhidas em *vials* de HPLC para posterior análise, enquanto que nas HeLa as amostras encontravam-se ainda turvas pelo que foram centrifugadas a 5 000g durante 2 minutos numa centrífuga e as amostras de “sobrenadante acetona” resultantes foram recolhidas em *vials* para análise no HPLC. Já os precipitados de proteína do citosol das células HeLa e MCF-7 controlo e extrato foram dissolvidos em 100 µL de água destilada e 100 µL de tampão Tris sem sais 50 mM (pH = 8,0), e centrifugados a 5 000g durante 2 minutos. Os “sobrenadantes dos precipitados proteicos” resultantes foram recolhidos em *vials* de HPLC e analisados por HPLC-DAD, enquanto que os precipitados proteicos restantes foram usados para posterior hidrólise descrita na secção seguinte (3.2.9.2). Foram também analisados por HPLC-DAD controlos com solventes usados durante a preparação das amostras, como uma solução de água destilada com tampão Tris sem sais 50 mM (pH = 8,0) e ainda uma solução de tampão de lise (100 µL) com acetona (300 µL) que foi seca sob um fluxo de azoto (restando 100 µL).

3.2.9.2 Análise de péptidos provenientes da hidrólise enzimática de proteínas do citosol de células HeLa e MCF-7 controlo e expostas a extrato de *A. absinthium*, por HPLC-DAD

As amostras dos precipitados proteicos das células HeLa e MCF-7 controlo e extrato restantes, referidas no final da secção 3.2.9.1, foram ainda tratadas para injeção e análise por HPLC-DAD. Estas amostras sofreram hidrólise enzimática para a quebra das proteínas em péptidos mais simples e pequenos, utilizando para isso a enzima pepsina, para posteriormente serem identificados por HPLC.

Deste modo o ensaio de hidrólise enzimática foi realizado utilizando suco enzimático artificial em contacto com os precipitados proteicos das células HeLa e MCF-7 controlo e extrato de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2.4.1, com algumas modificações. Assim juntou-se apenas 200 µL das amostras (precipitados proteicos dissolvidos em 200 µL de água destilada) e 200 µL de solução de

suco enzimático (pepsina) em *ependorfs* e incubaram-se as misturas reacionais a 37°C num banho termostaticado durante 1 hora. Posteriormente recolheu-se uma alíquota de 400 µL de cada mistura reacional no tempo 1 hora (1 hora depois da colocação das misturas) para um *ependorf* contendo 400 µL de metanol gelado. No caso das células MCF-7 (controlo e extrato) as amostras das proteínas hidrolisadas, foram imediatamente recolhidas em *vials* de HPLC para análise por HPLC-DAD. No caso das células HeLa centrifugaram-se as amostras das proteínas hidrolisadas a 5 000g durante 2 minutos, e os sobrenadantes resultantes foram analisados no HPLC. Nos ensaios de hidrólise das proteínas de ambas as células, HeLa e MCF-7, fez-se um controlo com suco enzimático e água. A análise por HPLC-DAD foi realizada utilizando as mesmas condições usadas na secção 3.2.9.1.

3.2.10 Análise de dados

O *software* utilizado para a análise dos dados foi o Microsoft® Excel 2016 e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para o tratamento estatístico dos resultados utilizou-se análise de variância (ANOVA) com $P \leq 0,05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química do extrato aquoso de *Artemisia absinthium*

A análise da decocção de *Artemisia absinthium* (1 mg/mL) por HPLC-DAD teve como propósito avaliar a composição química do extrato aquoso e identificar os principais compostos bioativos presentes. O cromatograma do extrato de *A. absinthium* obtido é apresentado na Figura 4.1.

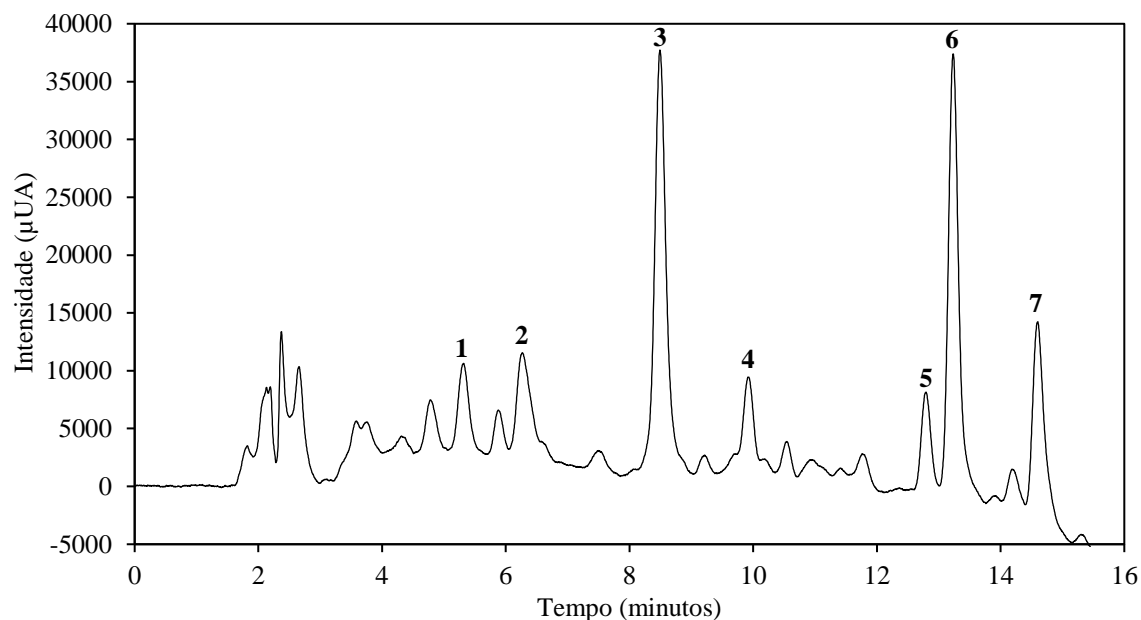


Figura 4.1: Cromatograma de HPLC-DAD de extrato aquoso de *Artemisia absinthium* (1 mg/mL). Os picos maioritários encontram-se numerados de 1 a 7, correspondentes aos compostos da Tabela 4.1. O tempo de retenção total foi de 30 min, estando representado apenas até aos 16 min.

A partir do cromatograma da Figura 4.1 obtido para o extrato aquoso de *A. absinthium* (1 mg/mL), observam-se os picos maioritários que foram identificados, que se apresentam numerados de 1 a 7. Foram obtidos os espectros de absorção UV-Vis dos picos maioritários de HPLC-DAD, encontrando-se representados os espectros UV-Vis dos picos principais 3 e 6 na Figura 4.2A e Figura 4.2B, respetivamente.

De modo a identificar, por comparação, alguns compostos presentes no extrato aquoso da planta, obteve-se também por HPLC-DAD os espectros de absorção UV-Vis dos padrões ácido clorogénico e cinarina, sendo que um dos espectros de absorção UV representativo destes padrões se encontra apresentado na Figura 4.2C e Figura 4.2D, respetivamente.

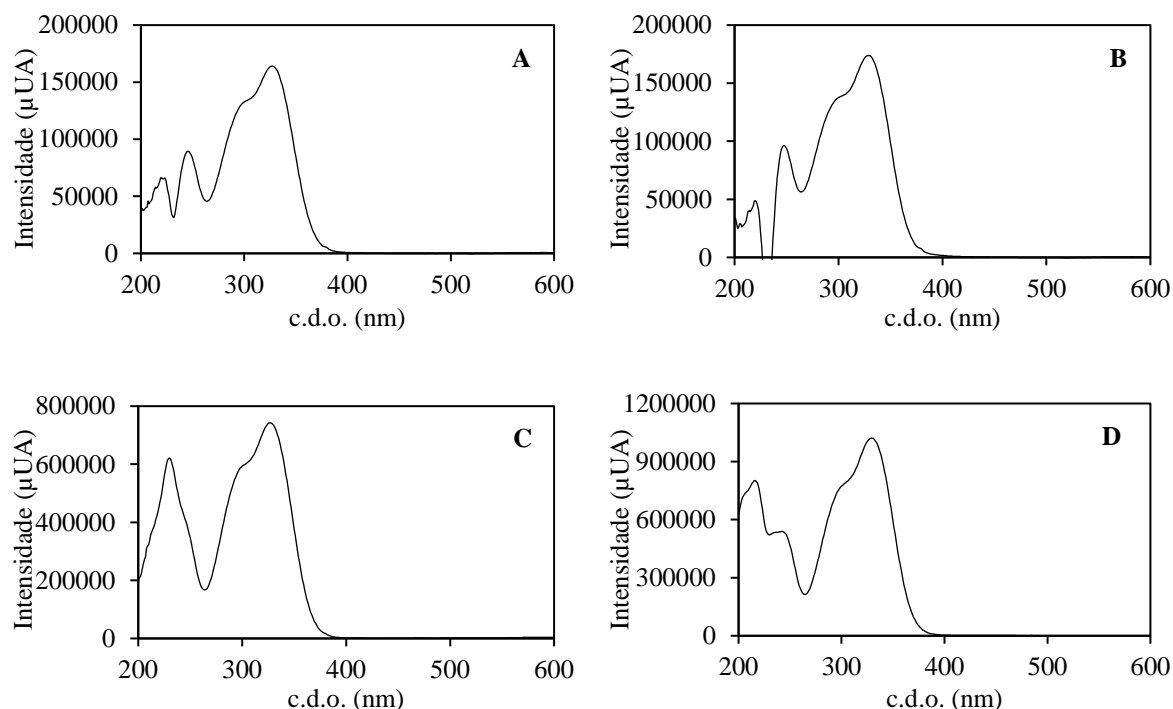


Figura 4.2: Espectros de absorção UV-Vis obtidos por HPLC-DAD para A) pico 3 ($T_r = 8,49$ min) e B) pico 6 ($T_r = 13,23$ min) do extrato aquoso de *A. absinthium* (1 mg/mL); C) padrão ácido clorogénico a 100 μ M ($T_r = 8,18$ min) e D) padrão cinarina a 100 μ g/mL ($T_r = 13,07$ min).

Ao analisar o espectro UV-Vis do pico 3 ($T_r = 8,49$ min), Figura 4.2A, pode verificar-se que o espectro é semelhante ao espectro UV típico obtido com o padrão ácido clorogénico, Figura 4.2C, e que ambos os compostos absorvem ao comprimento de onda de cerca de 330 nm. Deste modo pode fazer-se uma identificação preliminar do composto 3, com base no espectro UV obtido em comparação com o do padrão, uma vez que apresenta o tempo de retenção e o espectro de absorção UV-Vis típico do ácido clorogénico.

Existem também semelhanças entre o espectro de absorção UV-Vis e tempo de retenção do pico 6, Figura 4.2B, com o espectro UV-Vis obtido com o padrão cinarina (Figura 4.2D), que poderá indicar que se está na presença deste composto.

A identificação e confirmação dos compostos presentes no extrato aquoso de *A. absinthium* foi realizada por LC-MSⁿ.

4.2 Identificação de compostos presentes no extrato da decocção de *A. absinthium* por LC-MSⁿ

A análise do extrato aquoso da planta *A. absinthium* (1 mg/mL) por LC-MSⁿ teve como objetivo identificar e caracterizar os compostos presentes no extrato já anteriormente detetados por HPLC-DAD (secção 4.1). Os compostos foram tentativamente identificados e aparecem descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Identificação de compostos fenólicos do extrato aquoso de *A. absinthium*. Dados relativos a HPLC-DAD e LC-MSⁿ.

Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	$[M-H]^-$ m/z	Iões Fragmento MS/MS (Abundância Relativa %)	Identificação
1	5,32	241, 298, 328	370,93	352,85 (16,28); 208,90 (100,00); 190,94 (22,37)	Hexósido do ácido hidroxiferúlico
2	6,26	246, 329	370,99	352,87 (11,84); 208,90 (100,00); 190,96 (20,86)	Isômero de hexósido do ácido hidroxiferúlico
3	8,49	246, 327	353,64	190,91 (100,00); 179,04 (8,53); 172,96 (9,21); 135,01 (2,31)	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico
4	9,93	249, 298, 325	593,23	575,21 (8,12); 545,15 (2,25); 533,18 (2,45); 515,14 (2,63); 503,13 (31,34); 485,20 (3,01); 473,07 (100,00); 455,19 (5,22); 413,12 (4,10); 395,16 (2,67); 383,16 (29,00); 353,11 (52,15)	Apigenina-6,8-di- <i>C</i> -glucósido
5	12,79	251, 301, 326	515,24	352,92 (100,00); 335,14 (13,33); 299,01 (5,63); 255,09 (5,08); 203,03 (7,30); 191,04 (8,54); 178,97 (15,74); 172,94 (19,70)	Ácido 3,4- <i>O</i> -dicafeoilquinico
6	13,23	247, 329	515,55	352,93 (100,00); 191,06 (3,46)	Ácido 1,5- <i>O</i> -dicafeoilquinico
7	14,60	250, 329	515,19	352,92 (100,00); 335,10 (3,26); 316,99 (4,81); 298,95 (14,32); 255,10 (8,94); 203,01 (15,74); 191,07 (2,28); 179,03 (7,13); 173,01 (9,92)	Ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquinico

A Tabela 4.1 mostra os dados analíticos experimentais relativos aos picos maioritários retratados no perfil cromatográfico do extrato apresentado na Figura 4.1, que dizem respeito aos compostos fenólicos presentes no extrato da planta em estudo. Os tempos de retenção (Tr) e os comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{\max}) correspondem a dados da análise HPLC-DAD, enquanto que os valores m/z dos iões moleculares desprotonados $[M-H]^-$ e dos iões fragmento MSⁿ são relativos ao LC-MSⁿ. A identificação dos compostos fenólicos foi proposta com base no seu padrão de fragmentação obtido por LC-MSⁿ.

Os espectros LC-MS em modo iónico negativo relativos ao composto 1 (Tr = 5,32 min) e composto 2 (Tr = 6,26 min), bem como as suas estruturas, estão apresentados no Anexo A e Anexo B, respetivamente (Anexos). Em conformidade com os dados da análise LC-MSⁿ os compostos 1 e 2 foram tentativamente identificados como sendo um hexósido do ácido hidroxiferúlico e um isômero de hexósido do ácido hidroxiferúlico, respetivamente. Observando os espectros LC-MS em anexo que correspondem respetivamente a estes compostos (Anexo A e Anexo B), ambos apresentam um ião molecular desprotonado a m/z 371, indicando a presença de isômeros de hexósido do ácido hidroxiferúlico, sendo estes derivados do ácido ferúlico (Huang et al., 2015). Nestes espectros verifica-se ainda a presença do dímero do hexósido do ácido hidroxiferúlico a m/z 743 $[2 M-H]^-$.

Os espectros LC-MS/MS do ião $[M-H]^-$ a m/z 371 encontram-se na Figura 4.3 e Figura 4.4.

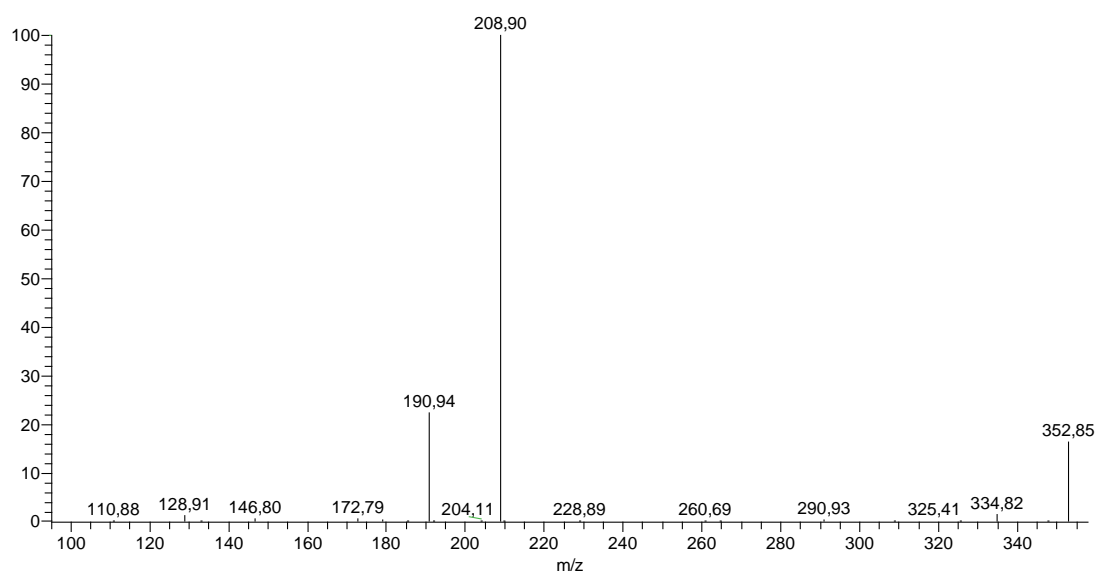


Figura 4.3: Espectro LC-MS/MS do composto 1 (Tr = 5,32 min).

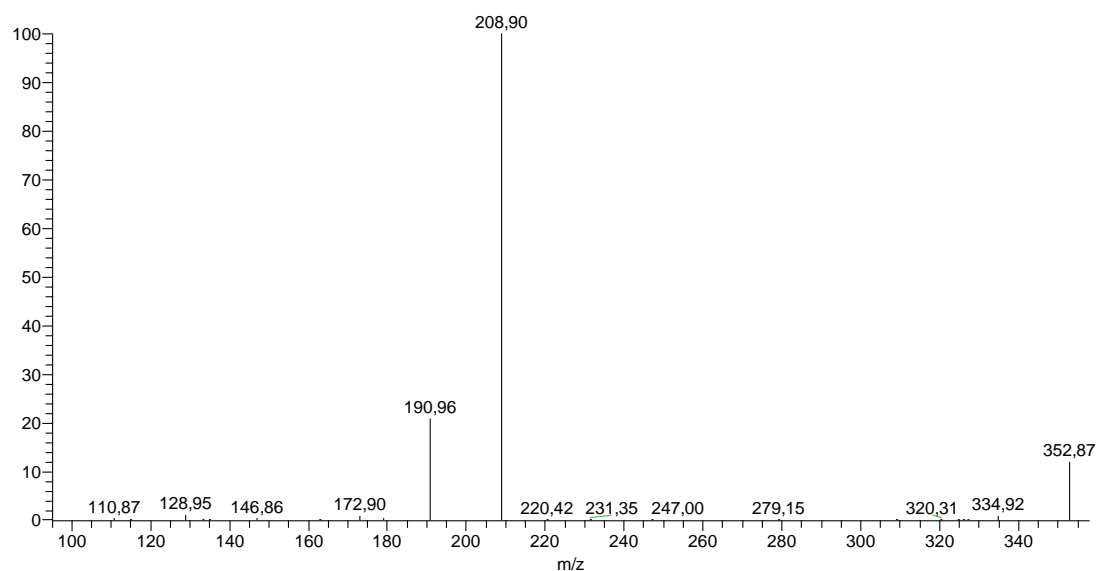


Figura 4.4: Espectro LC-MS/MS do composto 2 (Tr = 6,26 min).

Através dos espectros LC-MS/MS do ião m/z 371 relativos ao composto 1 (Figura 4.3) e composto 2 (Figura 4.4), e dos resultados apresentados na Tabela 4.1, pode-se observar os fragmentos resultantes da fragmentação deste ião, observando-se assim que ambos exibem o mesmo ião fragmento a m/z 209 sendo este o pico base, resultante da perda de 162 Da $[M-H-162]^-$ que é característica de uma unidade de açúcar de hexose, correspondendo ao ácido hidroxiferúlico. Nos espectros pode também observar-se outro ião fragmento que é resultante do ião a m/z 209, o ião a m/z 191, que adveio da perda de 18 Da, que corresponde a uma molécula de H_2O $[M-H-18]^-$ (Simirgiotis et al., 2009; Huang et al., 2015).

Contudo nos espectros LC-MS/MS dos compostos 1 e 2 é também visível um ião fragmento a m/z 353 resultante da fragmentação do ião $[M-H]^-$ a m/z 371, que sucedeu da perda de uma molécula de H_2O $[M-H-18]^-$.

O espectro LC-MS em modo iónico negativo relativo ao composto 3 (Tr = 8,49 min), bem como a sua estrutura, encontram-se representados no Anexo C (em anexo). De acordo com os dados da análise

LC-MSⁿ o composto 3 foi identificado como sendo o ácido 5-*O*-cafeoilquinico, também designado de ácido clorogénico. Observando o espectro LC-MS correspondente a este composto (Anexo C), como esperado observa-se um ião molecular desprotonado a m/z 353, verificando-se ainda a presença do dímero do ácido 5-*O*-cafeoilquinico a m/z 707 [$2 M-H$]⁻.

O espectro LC-MS/MS do ião [$M-H$]⁻ a m/z 353 está apresentado na Figura 4.5.

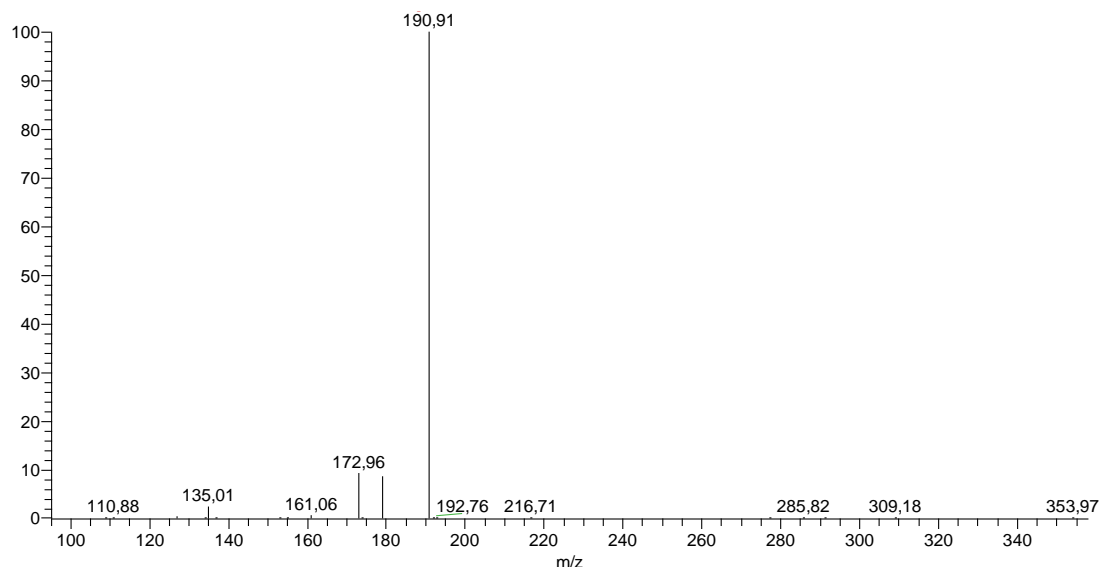


Figura 4.5: Espectro LC-MS/MS do composto 3 (Tr = 8,49 min).

Através do espectro LC-MS/MS do ião m/z 353 (Figura 4.5) e dos resultados apresentados na Tabela 4.1, pode-se observar os fragmentos resultantes da fragmentação deste ião, observando-se assim o ião fragmento a m/z 191, pico base, resultante da perda de 162 Da representando o ácido cafeico, correspondendo ao ácido quinico (Melguizo-Melguizo et al., 2014). No espectro é também visível outro ião fragmento que resulta do ião a m/z 191, o ião a m/z 173 resultante da perda de 18 Da, que corresponde a uma molécula de H₂O.

Contudo no espectro LC-MS/MS do composto 3 é também visível um ião fragmento a m/z 179 resultante da fragmentação do ião [$M-H$]⁻ a m/z 353, que sucedeu da perda de 174 Da [$M-H-174$]⁻.

Os dados da análise LC-MSⁿ obtidos vieram assim confirmar a identificação do composto 3 como ácido clorogénico, que tinha sido anteriormente proposta na secção 4.1. O ácido clorogénico e os seus derivados também já foram particularmente encontrados e relatados em estudos anteriores de outras espécies de *Artemisia*, como *Artemisia annua* e *Artemisia vulgaris* (Han et al., 2008; Melguizo-Melguizo et al., 2014).

O espectro LC-MS em modo iónico negativo relativo ao composto 4 (Tr = 9,93 min), bem como a sua estrutura, encontram-se representados no Anexo D (em anexos). De acordo com os dados da análise LC-MSⁿ o composto 4 foi identificado como sendo a apigenina-6,8-di-*C*-glucósido, também designado de vicenina-2. Observando o espectro LC-MS que corresponde a este composto (Anexo D), este exibe um ião molecular desprotonado a m/z 593.

O espectro LC-MS/MS do ião [$M-H$]⁻ a m/z 593 encontra-se na Figura 4.6.

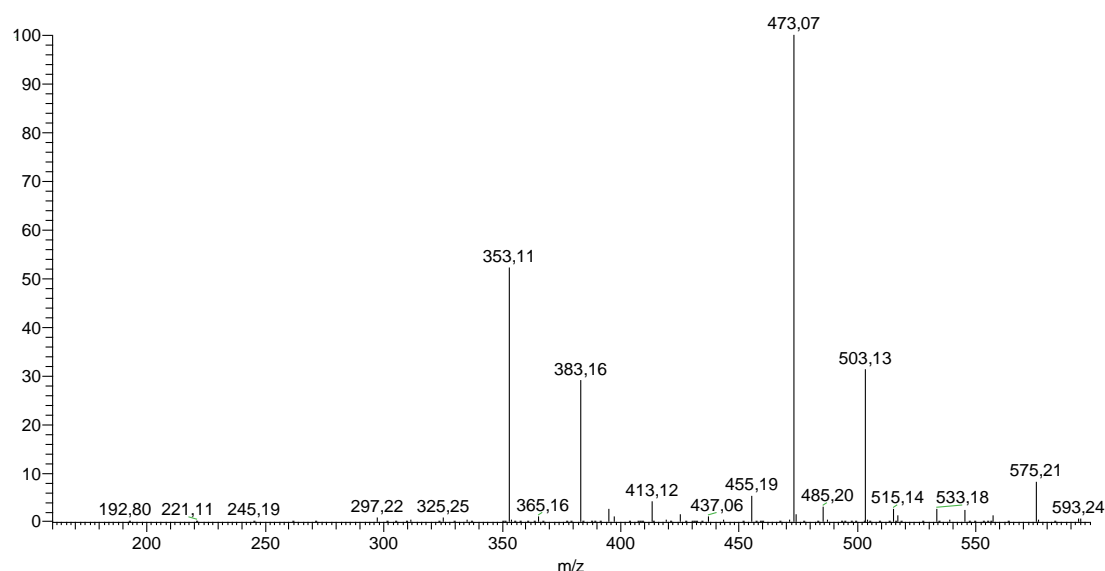


Figura 4.6: Espectro LC-MS/MS do composto 4 (Tr = 9,93 min).

Através do espectro LC-MS/MS do íon m/z 593 (Figura 4.6) e dos resultados apresentados na Tabela 4.1, pode-se analisar os fragmentos resultantes da fragmentação deste íon. Observa-se assim cinco íons fragmento mais intensos, os íons a m/z 575, m/z 503, m/z 473, m/z 383 e m/z 353, que correspondem ao típico padrão de fragmentação MS/MS de di-*C*-glicosil flavonas (Llorent-Martínez et al., 2015). O íon a m/z 575 resulta da perda de 18 Da, que corresponde a uma molécula de H_2O $[M-H-18]^-$, o íon a m/z 503 resulta da perda de 90 Da $[M-H-90]^-$, o íon a m/z 473 resulta da perda de 120 Da $[M-H-120]^-$, o íon a m/z 383 resulta em $[aglicona + 113]^-$ e o íon a m/z 353 resulta em $[aglicona + 83]^-$ (Llorent-Martínez et al., 2015; Han et al., 2008).

Os espectros LC-MS em modo iônico negativo relativos ao composto 5 (Tr = 12,79 min), composto 6 (Tr = 13,23 min) e composto 7 (Tr = 14,60 min) bem como as suas estruturas, encontram-se representados no Anexo E, Anexo F e Anexo G, respetivamente (em anexos). De acordo com os dados da análise LC-MSⁿ os compostos 5, 6 e 7 foram identificados como sendo o ácido 3,4-*O*-dicafeoilquinico, o ácido 1,5-*O*-dicafeoilquinico (também designado de cinarina) e o ácido 4,5-*O*-dicafeoilquinico, respetivamente. Observando os espectros LC-MS que correspondem respetivamente a estes compostos (Anexo E, Anexo F e Anexo G), estes exibem um íon molecular desprotonado a m/z 515, indicando a presença de isómeros posicionais do ácido dicafeoilquinico (Gobbo-Neto & Lopes, 2008).

Os espectros LC-MS/MS do íon $[M-H]^-$ a m/z 515 encontram-se na Figura 4.7, Figura 4.8 e Figura 4.9.

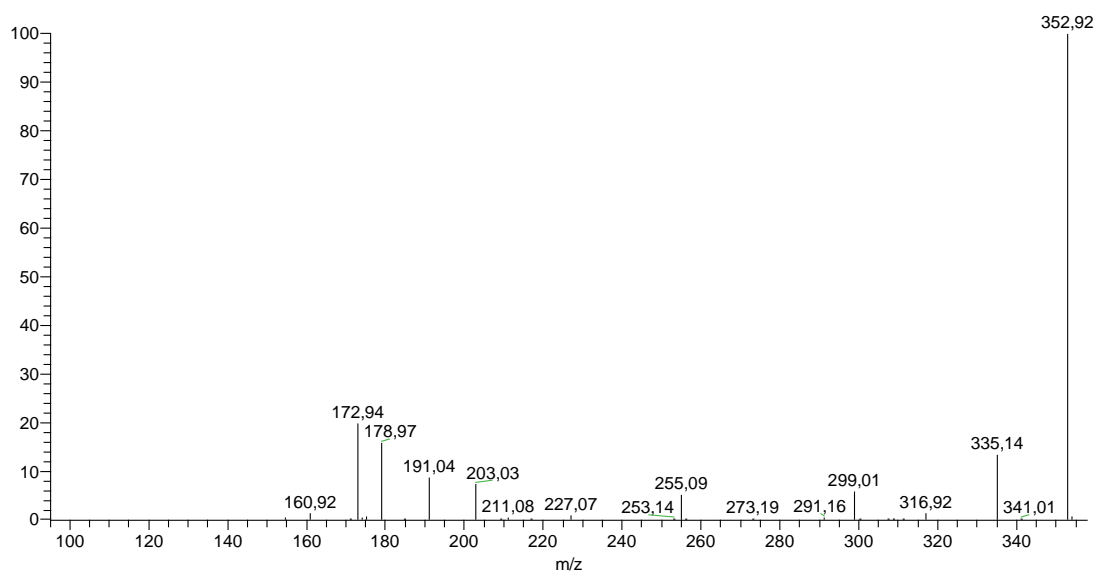


Figura 4.7: Espectro LC-MS/MS do composto 5 (Tr = 12,79 min).

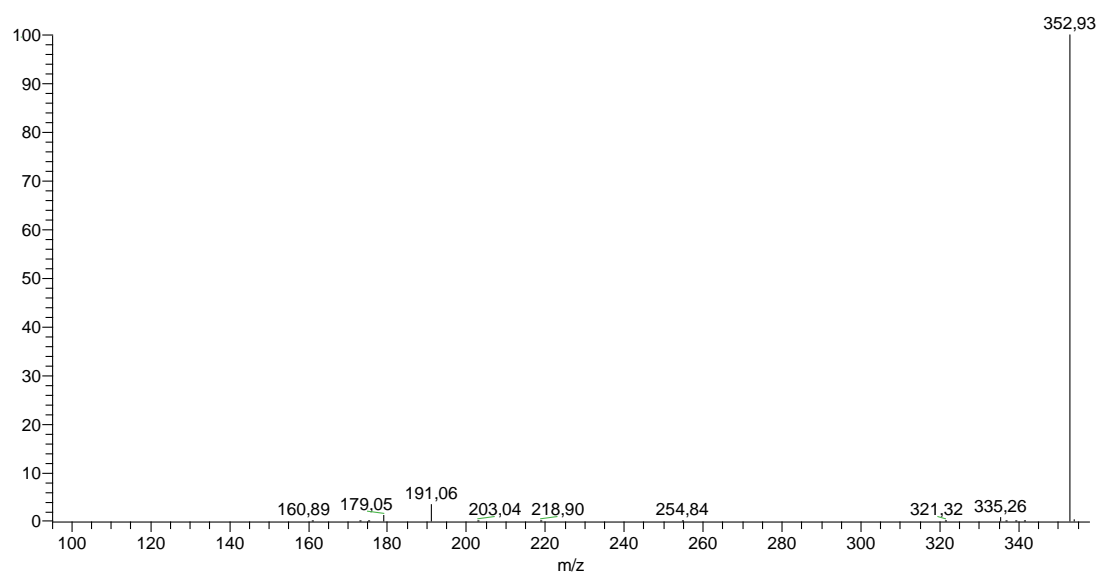


Figura 4.8: Espectro LC-MS/MS do composto 6 (Tr = 13,23 min).

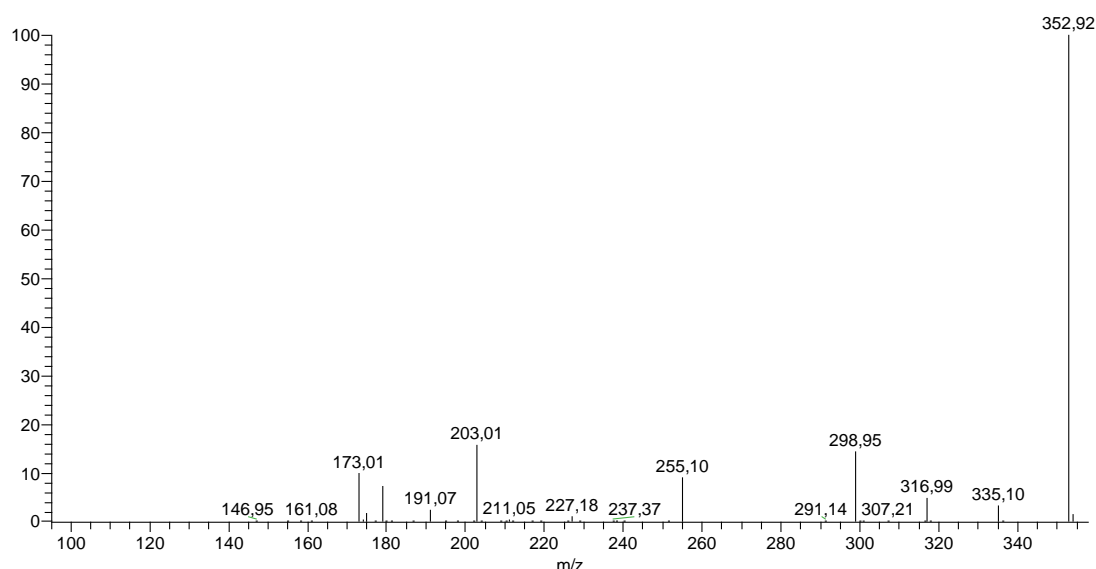


Figura 4.9: Espectro LC-MS/MS do composto 7 (Tr = 14,60 min).

Através dos espectros LC-MS/MS do ião m/z 515 relativos ao composto 5 (Figura 4.7), composto 6 (Figura 4.8) e composto 7 (Figura 4.9) e dos resultados apresentados na Tabela 4.1, pode-se analisar os fragmentos resultantes da fragmentação deste ião, observando-se assim que todos exibem o ião fragmento a m/z 353 sendo este o pico base, resultante da perda de 162 Da $[M-H-162]^-$, representando o ácido cafeico, correspondendo ao ácido cafeoilquinico. No entanto os seus padrões de fragmentação foram diferentes (Clifford et al., 2005; Gouveia & Castilho, 2013).

No espectro LC-MS/MS do composto 5 é também visível mais seis iões fragmento, os iões a m/z 335, m/z 299, m/z 255, m/z 203, m/z 179 e m/z 173, que resultam da fragmentação do ião a m/z 353. O ião fragmento a m/z 335 resulta da perda de 18 Da que corresponde à perda de uma molécula de H_2O $[M-H-18]^-$, o ião fragmento a m/z 299 resulta da perda de 36 Da que corresponde a mais duas moléculas de água $[M-H-18-36]^-$, o ião a m/z 255 resulta da perda de 44 Da $[M-H-36-18-44]^-$ e o ião a m/z 179 que é resultante da perda de 76 Da. No entanto os iões fragmento a m/z 203 e a m/z 173 também resultantes da fragmentação do ião a m/z 353, correspondem à perda de 150 Da $[M-H-150]^-$ e 30 Da $[M-H-150-30]^-$, respetivamente.

Já no espectro LC-MS/MS do composto 6 observa-se um outro ião fragmento pouco intenso que resulta do ião a m/z 353, o ião a m/z 191 resultante da perda de 162 Da $[M-H-162]^-$, representando o ácido cafeico.

Por último no espectro LC-MS/MS do composto 7 observam-se mais seis iões fragmento a m/z 317, m/z 299, m/z 255, m/z 203, m/z 179 e m/z 173, que também resultam da fragmentação do ião a m/z 353. O ião fragmento a m/z 317 resulta da perda de 36 Da que corresponde à perda de duas moléculas de H_2O $[M-H-36]^-$ e o ião fragmento a m/z 299 resulta da perda de 18 Da que corresponde a mais uma molécula de água $[M-H-36-18]^-$. As restantes fragmentações que ocorrem encontram-se explicadas anteriormente na análise do composto 5.

Os dados da análise LC-MSⁿ obtidos confirmam assim a identificação do composto 6 como cinarina, que já tinha sido proposta na secção 4.1.

Constatando os dados obtidos das análises por LC-MSⁿ, o extrato aquoso da planta *A. absinthium* é maioritariamente composto por ácido cafeoilquinico e ácidos dicafeoilquinicos, sendo o ácido clorogénico (ácido 5-*O*-cafeoilquinico) e a cinarina (ácido 1,5-*O*-dicafeoilquinico) os principais compostos obtidos do extrato da decocção desta planta, como mostra a Figura 4.1.

4.3 Quantificação de ácido clorogénico e cinarina no extrato aquoso

Uma vez que o ácido clorogénico e a cinarina se mostraram ser os principais compostos do extrato da decocção de *A. absinthium*, estimou-se a concentração destes dois compostos presente no extrato por HPLC-DAD usando os valores das áreas dos picos dos padrões (obtidas a 330 nm) para traçar retas de calibração em função da concentração, apresentadas em anexo (Anexo H-A e Anexo H-B).

Obteve-se também a área do pico maioritário 3, ácido clorogénico, identificado no cromatograma de HPLC-DAD para o extrato da planta, mas ao comprimento de onda de 330 nm, e através da reta de calibração apresentada no Anexo H-A, obteve-se a concentração de ácido clorogénico no extrato aquoso, indicada na Tabela 4.2. A área dos picos maioritários 5, 6 e 7, ácido 3,4-*O*-dicafeoilquinico, cinarina e ácido 4,5-*O*-dicafeoilquinico, respetivamente, identificados também no cromatograma de HPLC-DAD da Figura 4.1, foi também retirada no cromatograma de HPLC a 330 nm obtido para o extrato da planta. Assim através da reta de calibração da cinarina (Anexo H-B), a concentração de cinarina, bem como dos isómeros, presente no extrato aquoso foi estimada e aparece na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Valores de concentração de ácido clorogénico (μM), cinarina ($\mu\text{g/mL}$) e isómeros desta, no extrato aquoso de *A. absinthium* (1 mg/mL), obtidos pelas retas de calibração.

	Picos maioritários	Tr (min)	[Ác. clorogénico] (μM)	[Cinarina] ($\mu\text{g/mL}$)
<i>A. absinthium</i>	3	8,49	19,02	-
	5	12,79	-	1,30
	6	13,23	-	10,45
	7	14,60	-	5,12

Como se pode observar pela Tabela 4.2, a quantidade de ácido clorogénico é de 19,02 μM por mg de extrato aquoso e, a quantidade de cinarina é de 10,45 μg por mg de extrato. Os outros dois ácidos dicafeoilquinicos presentes no extrato, isómeros da cinarina (ácido 1,5-*O*-dicafeoilquinico) também foram quantificados estando indicado na Tabela 4.2 a sua concentração no extrato.

4.4 Metabolismo *in vitro* do extrato aquoso de *A. absinthium*

4.4.1 Digestão do extrato aquoso pelo suco gástrico artificial

Como vários compostos podem ser encontrados em chás de ervas diferentes, torna-se importante determinar o seu metabolismo após ser consumido como uma bebida, a fim de avaliar a atividade biológica final. Sendo assim este estudo descreve o metabolismo *in vitro*, pelo trato gastrointestinal superior, da decocção obtida a partir das folhas e caules de *A. absinthium*.

A digestão gástrica do extrato aquoso em questão foi realizada durante 4 horas sob condições ácidas e enzimáticas do estômago, utilizando suco gástrico artificial, e foram recolhidas alíquotas tanto às 0 horas, imediatamente após a adição do suco gástrico, como às 4 horas, depois da digestão, em triplicado. Estas alíquotas foram analisadas por HPLC-DAD, obtendo-se os cromatogramas respetivos de 200 a 600 nm e, posteriormente por tratamento dos resultados, os cromatogramas médios da Figura 4.10.

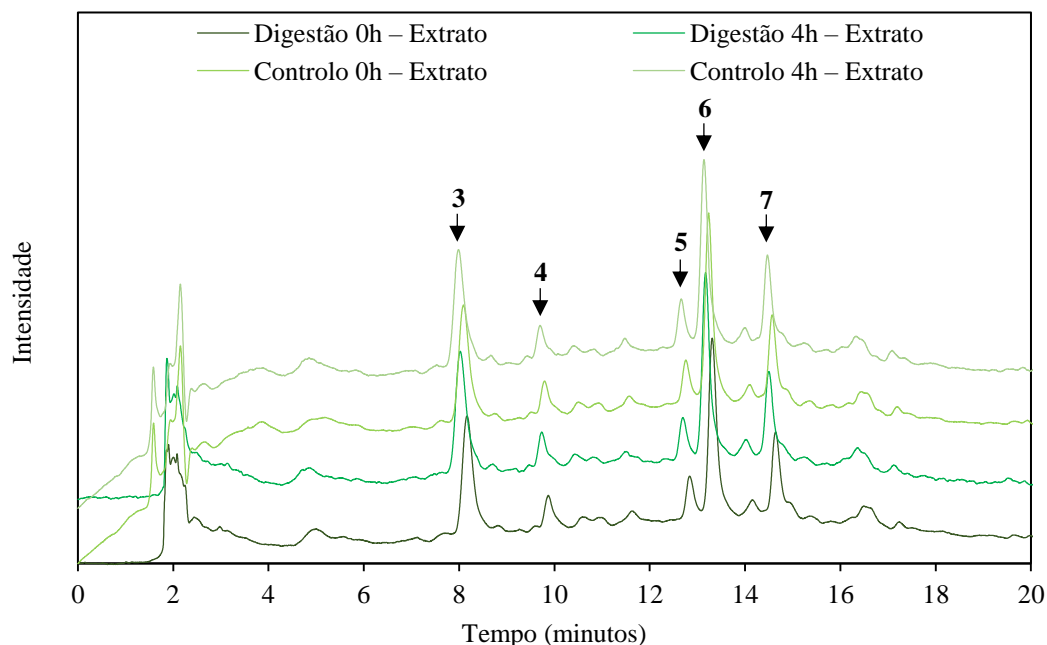


Figura 4.10: Cromatogramas médios obtidos por HPLC-DAD antes (0h) e após (4h) digestão do extrato aquoso de *A. absinthium* com suco gástrico artificial ou incubado com água (controlo). Identificação dos picos segundo a Tabela 4.1.

Aos cromatogramas antes (0h) e após (4h) a digestão do extrato aquoso com suco gástrico da Figura 4.10, foram subtraídos os respetivos controlos, obtidos às 0 horas e 4 horas, de suco gástrico e água, enquanto que aos cromatogramas controlo da incubação de extrato com água, às 0 horas e 4 horas, que correspondem a controlos do estudo, subtraiu-se o cromatograma do padrão água.

Os resultados da Figura 4.10 mostram que, ao comparar-se o cromatograma após as 4 horas de digestão do extrato (4h) com o cromatograma antes da digestão (0h), esse não apresentou degradação apreciável, uma vez que os picos maioritários representados com os números de 3 a 7, correspondentes a compostos identificados na secção 4.1 (ver Figura 4.1), continuaram idênticos. Isto indica que os compostos do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* não foram hidrolisados sob as condições ácidas do estômago, mesmo após as 4 horas de digestão.

No entanto para confirmar este resultado, foram calculadas as percentagens desses cinco compostos maioritários presentes no extrato da planta, após as 4 horas de digestão gástrica, de modo a saber a percentagem dos compostos às 4 horas em relação às 0 horas. Para isso obteve-se as áreas dos picos 3 a 7 para os triplicados realizados, tanto às 0 horas como às 4 horas de digestão do extrato, e calculou-se as percentagens dos compostos maioritários no final da digestão, apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valores das percentagens dos compostos correspondentes aos picos maioritários 3 a 7 do extrato da planta *A. absinthium*, após as 4 horas de digestão gástrica. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão.

Picos maioritários	Compostos	Média % de composto após 4h de digestão
3	Ácido clorogénico	100,39 \pm 0,40
4	Apigenina-6,8-di- <i>C</i> -glucósido	90,06 \pm 3,04
5	Ácido 3,4- <i>O</i> -dicafeoilquinico	97,81 \pm 0,70
6	Cinarina	99,66 \pm 1,08
7	Ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquinico	100,27 \pm 3,98

Ao analisar a Tabela 4.3, os resultados confirmam que a digestão gástrica *in vitro* não alterou a composição química do extrato da planta em estudo, uma vez que a percentagem dos compostos maioritários após as 4 horas de digestão foi de aproximadamente 100%, confirmando o observado nos cromatogramas da Figura 4.10. Portanto, pode concluir-se que os compostos fenólicos encontrados na decocção da planta são estáveis sob as condições do trato gastrointestinal superior. No caso do ácido clorogénico (composto 3), um dos principais compostos da decocção desta planta, também já foi relatado noutros estudos como estável sob condições de digestão gástrica, com as concentrações após digestão a manterem-se semelhantes às iniciais (Bouayed et al., 2012).

4.4.2 Digestão do extrato aquoso pelo suco pancreático artificial

A digestão pancreática do extrato aquoso da planta *A. absinthium* foi realizada do mesmo modo que a digestão gástrica, durante 4 horas, mas sob condições de intestino delgado, utilizando suco pancreático artificial. Neste estudo foram também recolhidas alíquotas tanto às 0 horas, imediatamente após a adição do suco pancreático, como às 4 horas, em triplicado. Estas foram injetadas em HPLC-DAD, obtendo-se os cromatogramas respetivos, de 200 a 600 nm, apresentados na Figura 4.11.

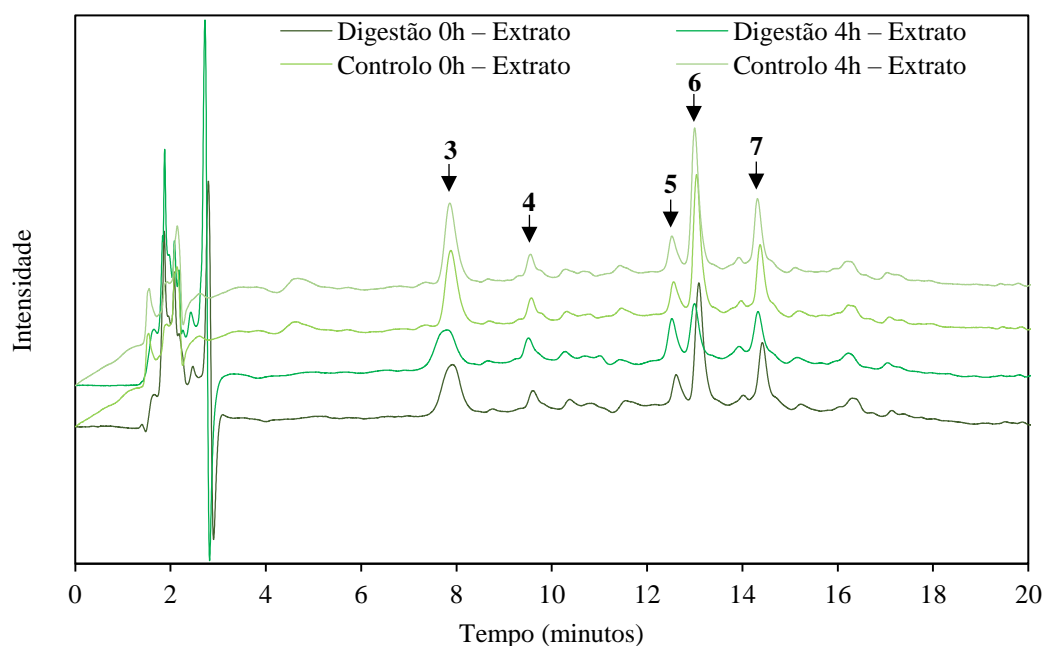


Figura 4.11: Cromatogramas médios obtidos por HPLC-DAD antes (0h) e após (4h) a digestão do extrato aquoso de *A. absinthium* com suco pancreático artificial ou incubado com água (controlo). Identificação dos picos segundo a Tabela 4.1.

Tal como na digestão gástrica, aos cromatogramas antes (0h) e após (4h) a digestão do extrato aquoso com suco pancreático da Figura 4.11, foram subtraídos os respetivos controlos, obtidos às 0 horas e 4 horas, de suco pancreático e água, enquanto que aos cromatogramas da incubação de extrato com água, às 0 horas e 4 horas, que correspondem a controlos do estudo, subtraiu-se o cromatograma do padrão água.

Ao comparar o cromatograma após as 4 horas de digestão do extrato (4h) com o cromatograma antes da digestão (0h) da Figura 4.11, observa-se que apresentou ligeiras alterações em alguns picos maioritários (identificados na secção 4.1 com os números 3 a 7), mas a degradação é insignificante uma vez que os picos continuaram idênticos, diminuindo apenas a sua concentração.

De modo a confirmar este resultado, foram calculadas as percentagens desses compostos presentes no extrato aquoso, após as 4 horas de digestão pancreática. As percentagens dos compostos no final da digestão, foram calculadas como anteriormente para a digestão gástrica, e encontram-se na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Valores das percentagens dos compostos correspondentes aos picos maioritários 3 a 7 do extrato da planta *A. absinthium*, após as 4 horas de digestão pancreática. Os valores correspondem à média \pm d.p..

Picos maioritários	Compostos	Média % de composto após 4h de digestão
3	Ácido clorogénico	70,74 \pm 1,25
4	Apigenina-6,8-di- <i>C</i> -glucósido	121,33 \pm 2,39
5	Ácido 3,4- <i>O</i> -dicafeoilquinico	149,50 \pm 2,39
6	Cinarina	41,95 \pm 0,98
7	Ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquinico	70,47 \pm 0,68

Os resultados observados na Tabela 4.4, confirmam que a digestão pancreática *in vitro* pode ter alterado a decocção da planta em estudo, uma vez que depois desta, alguns compostos maioritários, como o composto correspondente ao pico 3, 6 e 7, encontram-se em concentrações mais baixas. Assim os compostos fenólicos da decocção da planta parecem ser instáveis sob condições de intestino delgado (trato gastrointestinal inferior). Estes resultados estão de acordo com outros estudos relativos a compostos fenólicos, em que este grupo de compostos também foi alterado em ambiente intestinal, como é o caso do ácido clorogénico em que a sua concentração também diminuiu (Bouayed et al., 2012).

4.5 Atividade antioxidante da decocção da planta *A. absinthium*

Para determinar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato de *A. absinthium* recorreu-se ao método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), como referido na secção 3.2.5. A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável devido à deslocalização do eletrão de valência desemparelhado, que confere uma coloração violeta a esta molécula que é caracterizada por uma banda de absorção em etanol a 520 nm (Alves et al., 2010). Quando uma solução de DPPH é misturada com a de uma substância que pode doar um átomo de hidrogénio, origina a forma reduzida do DPPH, com a perda da cor violeta e dando lugar à coloração amarelo pálido, permitindo assim a monitorização visual da reação (Molyneux, 2004).

Para a determinação da atividade antioxidante foram utilizadas diferentes concentrações do extrato aquoso da planta afim de se determinar o valor de EC₅₀ deste. Deste modo traçaram-se três retas de regressão linear, Anexo I, correspondentes aos três ensaios realizados (em anexos), com as atividades antioxidantes, calculadas a partir das absorvâncias das amostras de extrato e da absorvância do controlo da solução de DPPH, em função das concentrações das amostras de extrato utilizadas. Através das retas de regressão linear determinou-se o valor de EC₅₀ para o extrato, isto é, a concentração de extrato aquoso que provoca extinção de 50% do radical DPPH (que corresponde a 50% da atividade antioxidante), que se apresenta na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Valor de EC₅₀ (µg/mL) do extrato aquoso de *A. absinthium*. O valor corresponde à média \pm d.p. de triplicados.

	EC ₅₀ (µg/mL)
<i>A. absinthium</i>	62,32 \pm 1,49

Assim de acordo com a Tabela 4.5, o EC_{50} para o extrato aquoso de *A. absinthium* é de $62,32 \pm 1,49 \mu\text{g/mL}$, que mostrou estar entre valores de EC_{50} reportados na literatura, para outros extratos aquosos de plantas do mesmo gênero ou família com atividade antioxidante, como é o caso do extrato de *Artemisia vulgaris* ($EC_{50} = 11,4 \mu\text{g/mL}$) e *Cynara cardunculus* ($EC_{50} = 123,1 \mu\text{g/mL}$) (Temraz & El-Tantawy, 2008; Falé et al., 2013). O extrato aquoso também apresentou atividade antioxidante na mesma ordem de grandeza do antioxidante padrão comercial BHT, com EC_{50} de $15,7 \mu\text{g/mL}$ (Mata et al., 2007).

A concentração dos principais compostos fenólicos do extrato aquoso, ácido clorogénico e a cinarina, foi estimada no valor de EC_{50} do extrato. Assim à concentração de $62,32 \mu\text{g/mL}$ (EC_{50}), o extrato aquoso continha $1,19 \mu\text{M}$ de ácido clorogénico, uma vez que, como determinado anteriormente na secção 4.3, a concentração de ácido clorogénico obtida em 1 mg/mL de extrato foi de $19,02 \mu\text{M}$, e continha também $1,05 \mu\text{g/mL}$ ($2,03 \mu\text{M}$) de cinarina e dos seus outros dois isómeros (ácidos dicafeoilquinicos). Comparando a concentração de ácido clorogénico presente no extrato ($1,19 \mu\text{M}$) com o valor de EC_{50} do padrão ácido clorogénico encontrado na literatura de $12,3 \mu\text{M}$ (Kweon et al., 2001), esta é menor, indicando que a atividade antioxidante do extrato aquoso não é apenas devida a este composto bioativo. Também comparando a concentração de cinarina e dos seus isómeros presente no extrato ($2,03 \mu\text{M}$) com o valor de EC_{50} relatado na literatura de $14,09 \mu\text{M}$ (Jun et al., 2007), esta é mais baixa, o que indica que a atividade antioxidante do extrato não é apenas devida à cinarina e seus isómeros. Assim a atividade antioxidante apresentada pelo extrato aquoso da planta pode ser devida ao conjunto de compostos fenólicos presentes no extrato.

4.6 Determinação da citotoxicidade do extrato de *A. absinthium* em HeLa, MCF-7 e Caco-2

A citotoxicidade do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* foi investigada em células humanas HeLa, MCF-7 e Caco-2, linhas celulares de adenocarcinoma, para avaliar o seu possível papel na terapia do cancro. Para tal realizou-se o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), um ensaio colorimétrico quantitativo para a sobrevivência de células de mamíferos. O MTT é um substrato amarelo pálido que é reduzido enzimaticamente e produz um produto formazan azul escuro quando incubado com células vivas, detetando apenas estas células viáveis (Mosmann, 1983).

A viabilidade celular das linhas em estudo tratadas com concentrações crescentes de extrato aquoso da planta foi obtida como descrito em 3.2.6.1, e através do tratamento dos resultados obtiveram-se os valores finais de viabilidade das linhas celulares, representados na Figura 4.12.

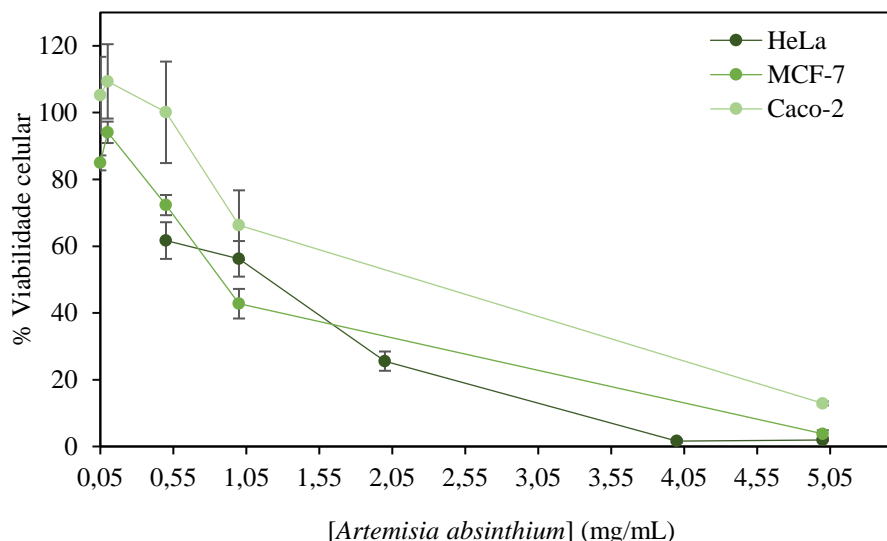


Figura 4.12: Viabilidade celular (%) de células HeLa, MCF-7 e Caco-2 na presença de concentrações crescentes de extrato aquoso de *A. absinthium*. Valores finais de viabilidade com d.p. de 6×2 replicados.

Os resultados da Figura 4.12 mostram que o extrato aquoso de *A. absinthium* mostrou-se capaz de reduzir a viabilidade das linhas celulares HeLa, MCF-7 e Caco-2, apresentando alguma toxicidade nestas células para certas concentrações de extrato testadas. Pode-se também verificar que a viabilidade das células Caco-2 é a menos afetada, quando comparada com as linhas HeLa e MCF-7.

Determinaram-se ainda os valores de IC₅₀ (mg/mL) do extrato de *A. absinthium* nas linhas celulares em estudo (Tabela 4.6), através das regressões lineares com a viabilidade (%) (de 6×2 replicados) em função das concentrações crescentes de extrato aquoso.

Tabela 4.6: Citotoxicidade do extrato aquoso de *A. absinthium* em células HeLa, MCF-7 e Caco-2. Valores de IC₅₀ (mg/mL) ± d.p. de 6×2 replicados.

	IC ₅₀ (mg/mL)		
	HeLa	MCF-7	Caco-2
<i>A. absinthium</i>	1,23 ± 0,10 ^a	0,88 ± 0,05 ^b	2,80 ± 0,38 ^c

Letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Como se pode observar pela Tabela 4.6, o extrato aquoso em estudo com uma concentração de $1,23 \pm 0,10$ mg/mL, $0,88 \pm 0,05$ mg/mL e de $2,80 \pm 0,38$ mg/mL diminui em 50% a viabilidade das células HeLa, MCF-7 e Caco-2, respetivamente. Estes valores de IC₅₀ indicam que o extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* não é citotóxico nas linhas celulares testadas, uma vez que são valores de concentração extremamente elevados que são superiores ao valor da literatura que é adotado em alguns estudos como referência de citotoxicidade para várias linhas celulares, 0,1 mg/mL (Oonsivilai et al., 2008). Apesar de o extrato aquoso não apresentar toxicidade significativa para as células em estudo, as linhas celulares responderam de forma diferente às concentrações de extrato testadas, apresentando maior efeito citotóxico em células MCF-7 e menor efeito tóxico nas células Caco-2.

Assim sendo conclui-se que a decocção da planta *A. absinthium* não é eficaz contra as linhas celulares cancerígenas em estudo.

Determinou-se ainda concentrações sub-tóxicas de extrato aquoso da planta para continuar os ensaios posteriores com as linhas celulares (ensaios de citotoxicidade e espectroscopia de FTIR), determinando-se assim a concentração de extrato da planta que provoca apenas uma diminuição de aproximadamente 25% da viabilidade celular (IC₂₅) na linha celular HeLa, $0,40 \pm 0,001$ mg/mL, e a

concentração de extrato aquoso que provoca diminuição de 20% da viabilidade celular (IC_{20}) na linha celular MCF-7, $0,35 \pm 0,04$ mg/mL.

De modo a investigar se a diminuição da viabilidade celular que é observada para as células HeLa tratadas com algumas concentrações de extrato aquoso é causada por um dos principais compostos fenólicos do extrato, o ácido clorogénico, foi observar-se a propriedade citotóxica deste. Para tal determinou-se a concentração de ácido clorogénico contida no extrato aquoso, quando este provoca uma diminuição de 80% da viabilidade celular ($IC_{80} = 2,30 \pm 0,04$ mg/mL), que foi de aproximadamente $43,75 \mu\text{M}$. Assim foi possível testar a citotoxicidade do ácido clorogénico através do teste de viabilidade do MTT (como descrito em 3.2.6.2), após o tratamento com várias concentrações do composto padrão ácido clorogénico, incluindo a determinada anteriormente (5; 10,2; 20; 44 e $50 \mu\text{M}$). Após o tratamento dos resultados obtidos, obtiveram-se os valores finais de viabilidade das células HeLa representados na Figura 4.13.

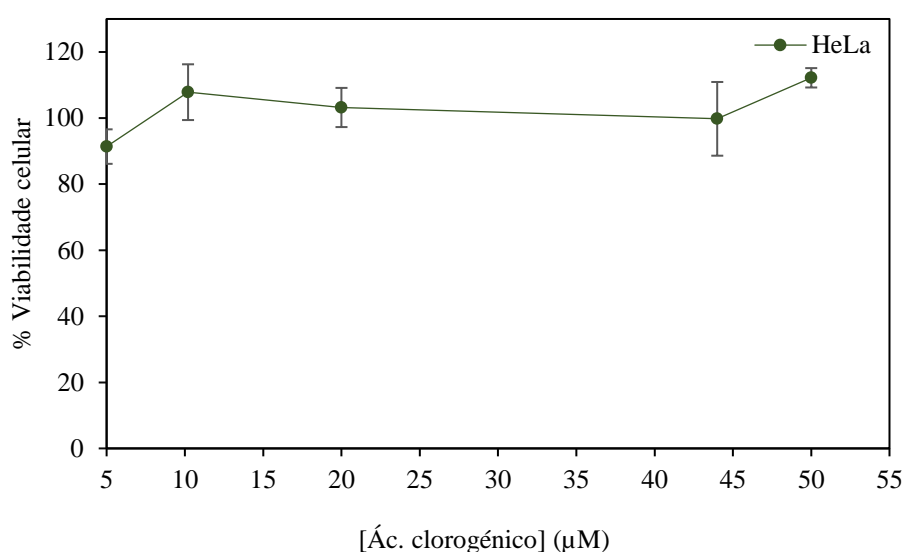


Figura 4.13: Viabilidade celular (%) de células HeLa na presença de concentrações crescentes do padrão ácido clorogénico. Valores finais de viabilidade com d.p. de 6×2 replicados.

Os resultados obtidos na Figura 4.13, mostram que o padrão ácido clorogénico não apresentou toxicidade às concentrações testadas, na linha celular HeLa, e que a uma concentração de $50 \mu\text{M}$ de ácido clorogénico, tal como a outras concentrações estudadas, o composto promoveu a proliferação celular. Os resultados sugerem assim, que a diminuição de viabilidade, nas células HeLa, provocada pelo extrato aquoso da planta, não é promovida pelo composto bioativo ácido clorogénico, podendo o padrão ácido clorogénico ser um controlo negativo de toxicidade.

A diminuição da viabilidade celular observada nas células HeLa expostas ao extrato aquoso, pode ser causada por outros compostos fenólicos presentes no extrato, mas não pelo seu conteúdo em ácido clorogénico.

Para ensaios posteriores com a linha celular HeLa, utilizou-se a concentração não tóxica de $50 \mu\text{M}$ de padrão ácido clorogénico.

4.7 Detecção de alterações bioquímicas em células HeLa e MCF-7 após exposição ao extrato aquoso de *A. absinthium*, por FTIR

As alterações bioquímicas em células HeLa e MCF-7, induzidas pelo tratamento com extrato aquoso de *A. absinthium*, foram detetadas por espectroscopia de FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier). A espectroscopia de FTIR é uma técnica baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula, em que a fração da radiação incidente que é absorvida numa determinada energia corresponde à frequência de um modo de vibração de ligações covalentes nas moléculas (Stuart, 2004). A técnica de espectroscopia de infravermelho é não destrutiva e fornece dados relacionados com a composição química das amostras em análise, sendo que no caso das amostras serem células, as pequenas mudanças nos espectros de infravermelho destas, induzidas por condições ambientais ou drogas, podem fornecer um sinal preciso da mudança metabólica que acontece nas células como resposta a uma mudança no meio de crescimento (Fale et al., 2015; Mignolet et al., 2016).

Assim antes de se analisar as variações da composição bioquímica das células em estudo, induzidas por extrato aquoso de *A. absinthium*, nos espectros de FTIR, é essencial compreender que componentes da célula contribuem para os espectros de FTIR e quais as suas regiões de absorção de infravermelho importantes para a análise. Segundo Mignolet et al. (2016) dentro da região de infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) os lípidos têm uma forte absorção na zona de 3000 a 2800 cm^{-1} , e por isso as contribuições num espectro celular nesta zona derivam fundamentalmente de lípidos. De acordo com Derenne et al. (2011), a região de 1800 a 1700 cm^{-1} é também característica dos lípidos mas de fosfolípidos, já a região entre 1700 e 1300 cm^{-1} é conhecida pela absorção de proteínas, e a absorção na zona de 1300 a 900 cm^{-1} é especialmente devido a hidratos de carbono e fosfatos, sobretudo aos grupos fosfato associados aos ácidos nucleicos.

Contudo na Tabela 4.7 encontram-se resumidas algumas bandas de absorção de radiação infravermelho típicas observadas nos espectros de FTIR da análise de células secas, bem como as suas atribuições.

Tabela 4.7: Principais bandas de absorção de infravermelho dos espectros de FTIR e atribuições aos respetivos componentes químicos das células.

Número de onda teórico (cm^{-1})	Número de onda considerado (cm^{-1})	Representação	Atribuições
2955	2958	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	Modo de vibração de estiramento assimétrica dos grupos CH_3 contidos principalmente em cadeias acil de lípidos (Gasper et al., 2009)
2922	2924	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	Modo de vibração de estiramento assimétrica dos grupos CH_2 contidos principalmente em cadeias acil de lípidos (Gasper et al., 2009)
1738	1734	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Vibração de estiramento de $\text{C}=\text{O}$ do éster de fosfolípidos (Gasper et al., 2009)
1650	1653	Amida I	Vibração de estiramento de ligações $\text{C}=\text{O}$ da proteína amida, designada Amida I (Mignolet et al., 2016)
1540	1541;1545	Amida II	Vibração da ligação N-H da proteína amida, designada Amida II (Mignolet et al., 2016)
1241	1238	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	Modo de vibração assimétrica de grupos PO_2^- de ácidos nucleicos (DNA e RNA) (Mignolet et al., 2016)
1085	1084	$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$	Modo de vibração simétrica de grupos PO_2^- de ácidos nucleicos (DNA e RNA) (Mignolet et al., 2016)

ν = vibração de estiramento.

Para a análise de espectroscopia de FTIR, as células HeLa foram tratadas com uma concentração sub-tóxica de extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL) obtida na secção 4.6, durante 48 horas, como descrito na secção 3.2.7.1. As células HeLa foram também expostas a uma concentração não tóxica de padrão ácido clorogénico ($50 \mu M$) como descrito na secção 3.2.7.2. Os espectros de FTIR resultantes da análise de células HeLa secas, tanto controlo (sem tratamento), bem como tratadas com extrato da planta ou ácido clorogénico, encontram-se representados na Figura 4.14.

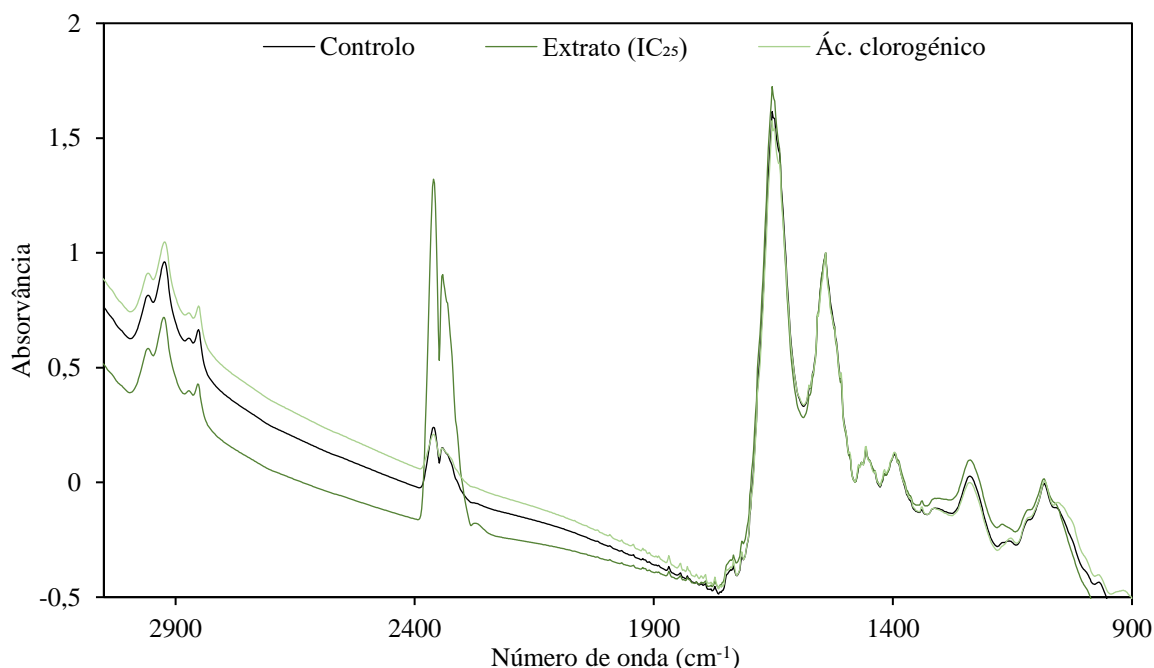


Figura 4.14: Espectros médios de FTIR de células HeLa controlo (sem tratamento, apenas em meio) e de células HeLa expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL) e expostas a ácido clorogénico ($50 \mu M$). Os espectros são a média de três medições e no caso do controlo de 3x2 medições. Os espectros individuais usados para os espectros médios foram normalizados pela altura do pico da Amida II na região de 1541 e 1479 cm^{-1} .

Na Figura 4.14 encontram-se os espectros médios de FTIR referentes a células HeLa controlo e células HeLa expostas a extrato de *A. absinthium* e a ácido clorogénico que foram obtidos. É de salientar que as bandas observadas na região de 2800 a 1800 cm^{-1} nos espectros de FTIR da Figura 4.14 não dizem respeito a bandas de absorção das células, pois são contribuições de CO_2 atmosférico (Mignolet et al., 2016).

Na Figura 4.14 é possível visualizar as variações espectrais observadas nos espectros médios de FTIR de células HeLa tratadas com extrato aquoso de *A. absinthium* e células HeLa tratadas com ácido clorogénico, relativamente a células HeLa controlo. É de salientar que tanto o extrato aquoso como o padrão ácido clorogénico apresentam espectros de FTIR com contribuições muito baixas nas regiões analisadas nos espectros de FTIR de células, mesmo em concentrações que assumem que todos os compostos serão retidos no interior das células (ver Anexo J).

As alterações químicas que ocorreram nas células em estudo, quando expostas a extrato da planta e a ácido clorogénico, foram calculadas por razões entre as principais bandas de absorção representadas nos espectros de FTIR da Figura 4.14 e discutidas na Tabela 4.7.

Para o cálculo das razões do ensaio com extrato aquoso e do ensaio com ácido clorogénico, foi necessário proceder ao tratamento dos dados obtidos através dos espectros individuais de cada ensaio (que foram usados para os espectros médios). Foram calculadas as alturas das bandas, selecionadas com base na Tabela 4.7 (número de onda considerado (cm^{-1})), subtraindo-se o valor de absorvância mínimo da banda ao valor de absorvância máximo desta.

Os valores de altura respetivos às bandas de absorção dos espectros ($\nu_{as}(\text{CH}_3)$, $\nu_{as}(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{C}=\text{O})$, Amida II e $\nu_s(\text{PO}_2^-)$), foram usados para o cálculo das razões $\nu_{as}(\text{CH}_3)/\text{Amida II}$, $\nu_{as}(\text{CH}_2)/\text{Amida II}$, $\nu_{as}(\text{CH}_2)/\nu_{as}(\text{CH}_3)$, $\nu(\text{C}=\text{O})/\text{Amida II}$, $\nu(\text{C}=\text{O})/\nu_{as}(\text{CH}_2)$ e $\nu_s(\text{PO}_2^-)/\text{Amida II}$. Em seguida fez-se a normalização, pelo respetivo controlo, dos valores das razões obtidos e posteriormente a média dos mesmos. Deste modo foram obtidas as razões médias anteriormente referidas, tanto para as células HeLa tratadas com extrato, como para células HeLa tratadas com ácido clorogénico e ainda para células HeLa controlo, sendo que neste último caso as razões médias foram realizadas com seis valores normalizados, que correspondem aos dois ensaios realizados (ensaio com extrato da planta e ensaio com ácido clorogénico). Estes resultados encontram-se representados no gráfico de barras da Figura 4.15, e foi utilizada a análise estatística ANOVA para investigar a correlação das amostras testadas dentro de cada razão.

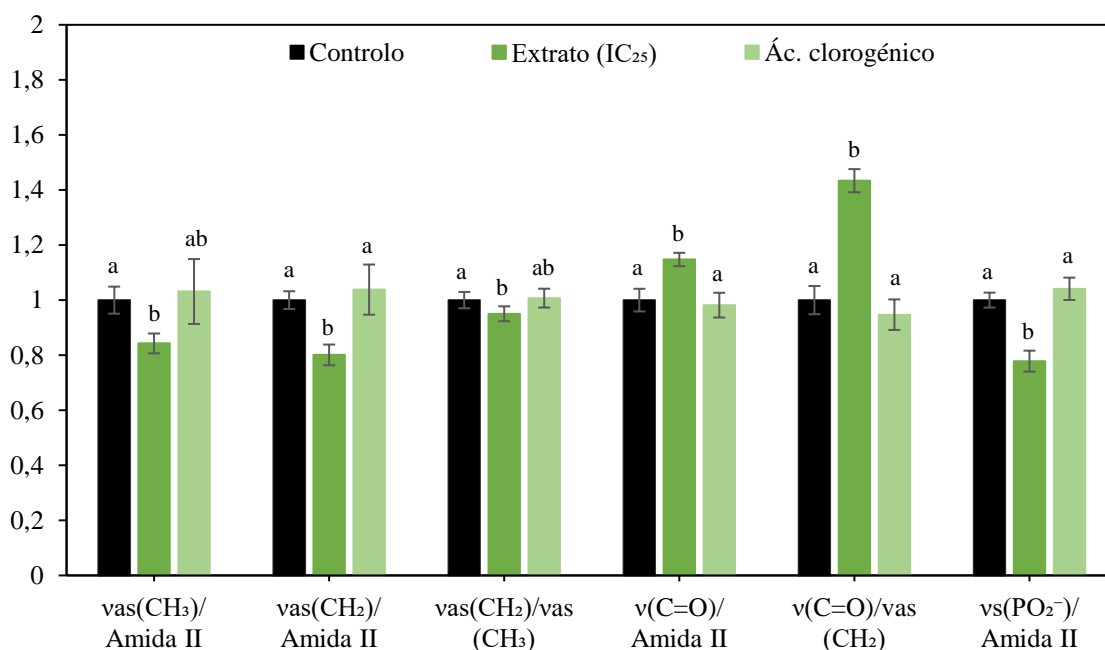


Figura 4.15: Razões médias das bandas de absorção dos espectros de FTIR de células HeLa controlo (sem tratamento, apenas em meio) e de células HeLa expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* (IC₂₅ = 0,40 mg/mL) e expostas a ácido clorogénico (50 μM). ^{a-b}Letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) para a mesma razão.

Na Figura 4.15 através das razões representadas, pode verificar-se que existem alterações moleculares na linha celular HeLa, após 48 horas de exposição ao extrato aquoso de *A. absinthium* (IC₂₅) em relação ao controlo (células HeLa sem tratamento). Com o padrão ácido clorogénico (50 μM) não há alterações significativas.

Em primeiro pode observar-se pela razão $\nu_{as}(\text{CH}_3)/\text{Amida II}$ que em células HeLa tratadas com extrato aquoso em comparação com células controlo, ocorreu uma diminuição de grupos CH_3 das cadeias acil dos lípidos em relação à quantidade de proteína na célula, isto é, indicando que há diminuição da quantidade de lípidos totais. Observa-se também que houve uma diminuição significativa da razão $\nu_{as}(\text{CH}_2)/\text{Amida II}$ quando as células foram tratadas com extrato, que pressupõe uma diminuição de grupos CH_2 de cadeias acil dos lípidos em relação ao teor de proteína na célula, sugerindo a diminuição das cadeias lipídicas relativamente à quantidade proteica, que pode ser devido à diminuição da quantidade de lípidos. Já ao nível da razão $\nu_{as}(\text{CH}_2)/\nu_{as}(\text{CH}_3)$ das células tratadas com extrato em relação às células controlo, as alterações foram significativas ($P = 0,046$), indicando assim que há uma diminuição de grupos CH_2 de cadeias acil dos lípidos em relação a grupos CH_3 das mesmas, ou seja, há

uma diminuição do comprimento das cadeias acil lipídicas, que sugere uma alteração na composição dos lípidos totais.

As alterações provocadas pelo efeito do extrato de *A. absinthium* em células HeLa, em comparação com células controlo, são também visíveis pela razão $\nu(\text{C=O})/\text{Amida II}$, que parece sugerir um aumento de C=O do éster dos fosfolípidos relativamente ao teor de proteína na célula, o que pode significar um aumento da quantidade de lípidos de membrana celular na célula, os fosfolípidos. Verifica-se também um aumento de C=O do éster dos fosfolípidos relativamente à quantidade de grupos CH_2 das cadeias acil de lípidos na célula (razão $\nu(\text{C=O})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$), sugerindo também que existiu um aumento da quantidade de fosfolípidos na célula em relação à quantidade de lípidos (outras classes). As alterações da membrana celular associadas ao processo de apoptose, como a exposição à fosfatidilserina (um fosfolípido) e o desenvolvimento de membrana para formação de vesículas podem explicar o aumento da absorvância de C=O do éster dos fosfolípidos (Wu et al., 2015). Assim, uma vez que é verificado o aumento do teor de fosfolípidos de membrana celular em células HeLa tratadas com extrato da planta, em comparação com células controlo, estes resultados sugerem que pode estar a ocorrer formação de vesículas (corpos apoptóticos) devido ao processo de morte celular por apoptose.

No gráfico da Figura 4.15 também se verificaram alterações significativas na razão $\nu_s(\text{PO}_2^-)/\text{Amida II}$ para células tratadas com *A. absinthium*, comparando com células controlo, pois há uma diminuição de grupos fosfato de ácidos nucleicos (DNA e RNA) por quantidade de proteína na célula, sugerindo que a quantidade de ácidos nucleicos na célula pode ser menor, indicando que está a ocorrer morte celular, que pode ser por apoptose. Outros autores já observaram por FTIR a diminuição de ácidos nucleicos, noutras linhas celulares, como em células HL-60 (linha celular de leucemia promielocítica humana) tratadas com compostos citotóxicos que induziram apoptose (Gasparri & Muzio, 2003).

Os resultados obtidos sugerem que o extrato aquoso de *A. absinthium* (IC_{25}) provoca variações de componentes químicos na linha celular HeLa, podendo indicar que o extrato está a promover a morte celular por apoptose. Também já foi observado que extratos de *A. absinthium* induzem apoptose em linhas celulares cancerígenas, como MCF-7, visível por outras técnicas, como microscopia de fluorescência em que foram observadas alterações da morfologia celular, nomeadamente condensação nuclear e fragmentação de núcleos indicando apoptose, que foi confirmada por análise de citometria de fluxo (Shafi et al., 2012).

Através das razões representadas no gráfico da Figura 4.15 para as células tratadas com o padrão ácido clorogénico ($50 \mu\text{M}$), verifica-se que para todas elas não existem alterações significativas quando comparadas com as das células controlo, sugerindo portanto que o ácido clorogénico não altera as biomoléculas das células em estudo.

Comparando ainda as alterações das várias razões, à exceção de $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)/\text{Amida II}$ e $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, provocadas em células HeLa pela exposição ao extrato de *A. absinthium* com células expostas ao ácido clorogénico, pode verificar-se que essas alterações foram semelhantes às alterações observadas aquando da comparação com células controlo. Isto significa que as variações dos componentes químicos na linha celular HeLa quando esta é exposta ao extrato aquoso, não são provocadas pelo ácido clorogénico presente no extrato, mas sim por outros compostos presentes nele, ou destes em conjunto com o ácido clorogénico.

Foi também realizada a análise de espectroscopia de FTIR de células MCF-7, em que estas foram expostas a uma concentração sub-tóxica de extrato aquoso de *A. absinthium* ($\text{IC}_{20} = 0,35 \text{ mg/mL}$) obtida na secção 4.6, durante 48 horas, como descrito na secção 3.2.7.1. Os espectros de FTIR resultantes da análise de células MCF-7 secas, tanto controlo (crescidas em meio de cultura) bem como tratadas com extrato, encontram-se representados na Figura 4.16.

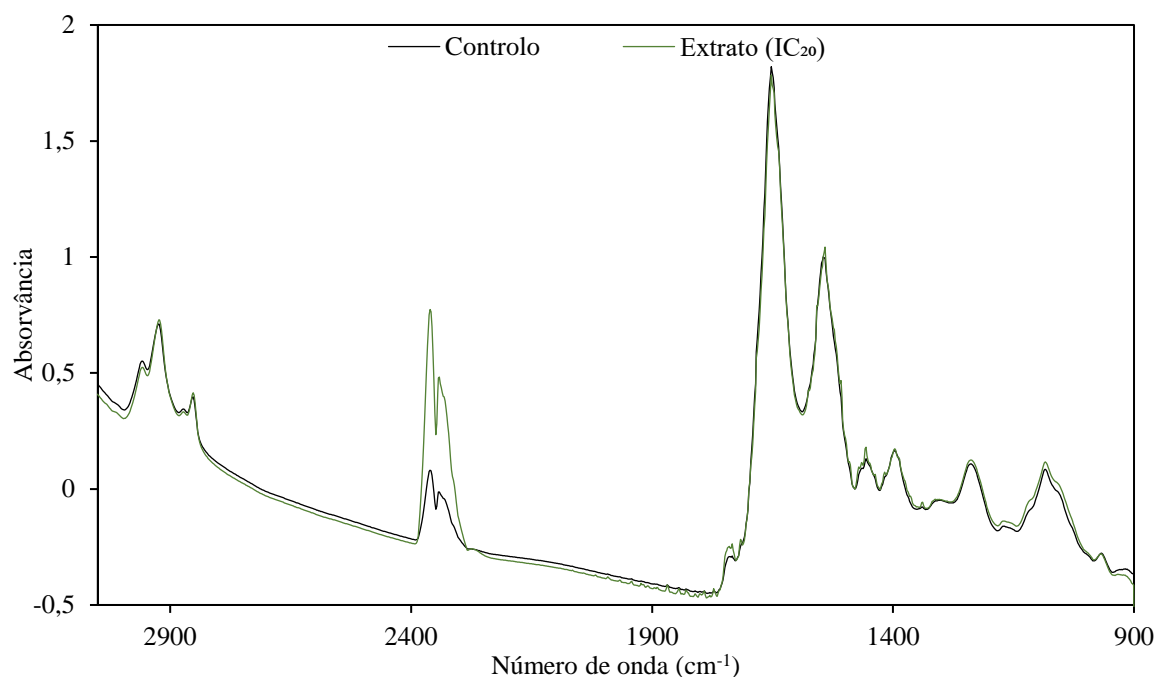


Figura 4.16: Espectros médios de FTIR de células MCF-7 controlo (sem tratamento) e de células MCF-7 expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{20} = 0,35$ mg/mL). Os espectros são a média de três medições. Os espectros individuais usados para os espectros médios foram normalizados pela altura do pico da Amida II na região de 1545 e 1479 cm^{-1} .

Na Figura 4.16 estão representados os espectros médios de FTIR referentes a células MCF-7 tratadas com extrato de *A. absinthium* e células MCF-7 controlo que foram obtidos. A Figura 4.16 mostra as variações dos espectros em termos de conteúdo químico das células tratadas com extrato de *A. absinthium*, em relação a células controlo. É de evidenciar, que tal como mencionado anteriormente na análise de espectroscopia de FTIR de células HeLa, também o extrato aquoso apresenta espectro de FTIR com contribuições muito baixas nas regiões analisadas nos espectros das células (ver Anexo J).

Tal como na análise de espectroscopia de FTIR de células HeLa, também em células MCF-7 as alterações que ocorreram foram calculadas por razões entre as bandas de absorção dos espectros de FTIR, e da mesma forma que foi descrita a cima para o cálculo das razões nas células HeLa. Os resultados obtidos das razões médias das células MCF-7 tratadas com extrato da planta e das células MCF-7 controlo, encontram-se representados no gráfico de barras da Figura 4.17.

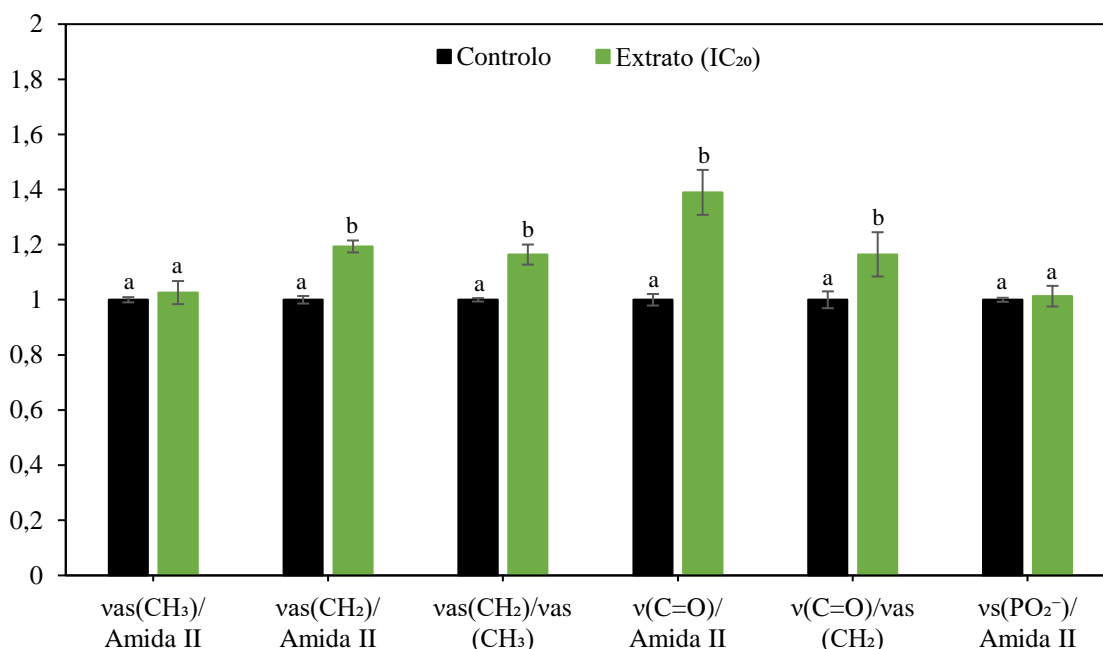


Figura 4.17: Razões médias das bandas de absorção dos espectros de FTIR de células MCF-7 controlo (sem tratamento, apenas em meio) e de células MCF-7 expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* (IC₂₀ = 0,35 mg/mL). ^{a-b}Letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) para a mesma razão.

Através dos resultados da Figura 4.17 pode observar-se pelas razões representadas, que existem algumas alterações moleculares nas células MCF-7 expostas ao extrato aquoso da planta *A. absinthium* (IC₂₀), quando comparadas com células controlo (sem tratamento).

Observa-se que não existem alterações significativas da razão $v_{as}(\text{CH}_3)/\text{Amida II}$ nas células em estudo expostas ao extrato de *A. absinthium*, em comparação com células controlo, isto é, manteve-se a quantidade de grupos CH₃ das cadeias acil dos lípidos relativamente à quantidade de proteína na célula, o que sugere que não há variações na quantidade de lípidos totais. No entanto, verifica-se que existe um aumento significativo da razão $v_{as}(\text{CH}_2)/\text{Amida II}$ em células tratadas com extrato quando comparadas com o controlo, isto é, um aumento de grupos CH₂ de cadeias acil lipídicas em relação ao teor de proteína na célula, que pode sugerir um aumento das cadeias lipídicas relativamente à quantidade proteica, e por isso a composição dos lípidos é diferente. Na verdade, as alterações observadas ao nível da razão $v_{as}(\text{CH}_2)/v_{as}(\text{CH}_3)$ indicaram também que há um aumento de grupos CH₂ de cadeias acil dos lípidos em relação aos grupos CH₃ das mesmas, e por isso há alteração na composição dos lípidos totais.

Em relação à razão $v(\text{C=O})/\text{Amida II}$ as alterações induzidas pelo extrato de *A. absinthium* nas células MCF-7, sugerem um aumento de C=O do éster dos fosfolípidos relativamente à quantidade de proteína na célula, o que pode significar um aumento da quantidade de fosfolípidos (lípidos de membrana celular) na célula. Também se verificaram alterações na razão $v(\text{C=O})/v_{as}(\text{CH}_2)$ correspondente a células com extrato, em comparação com células controlo, uma vez que também se observou um aumento de C=O do éster dos fosfolípidos relativamente à quantidade de grupos CH₂ das cadeias acil de lípidos na célula, o que pode significar que houve aumento da quantidade de fosfolípidos na célula em relação à quantidade de outras classes de lípidos. Na verdade o aumento da absorvância de C=O do éster dos fosfolípidos pode ser explicado pelas alterações da membrana celular associadas ao processo de apoptose, como a exposição à fosfatidilserina e o desenvolvimento de membrana para formação de vesículas (Wu et al., 2015). Assim o aumento de fosfolípidos observado em células tratadas com extrato da planta, em comparação com células controlo, supõe que pode estar a haver formação de vesículas devido à morte celular por apoptose.

Na Figura 4.17, verifica-se ainda que não existem alterações significativas da razão $v_s(\text{PO}_2^-)/\text{Amida II}$ em células MCF-7 expostas ao extrato de *A. absinthium*, comparativamente com células controlo, isto é, a quantidade de grupos fosfato dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) por quantidade de proteína na célula permanece inalterada, podendo assim sugerir que não há variações na quantidade de ácidos nucleicos.

Deste modo os resultados pressupõem que o extrato aquoso de *A. absinthium* (IC_{20}) provocou algumas variações dos componentes químicos das células MCF-7, nomeadamente o aumento de lípidos de membrana, os fosfolípidos, que como foi visto anteriormente supõe que pode ser devido a apoptose, sugerindo portanto que o extrato pode estar a promover a morte celular por apoptose. Outros autores já observaram que extratos de *A. absinthium* induzem apoptose na linha celular MCF-7, que foi visível por técnicas de microscopia de fluorescência, em que foram observadas alterações da morfologia celular, como condensação nuclear e fragmentação de núcleos indicando apoptose (Shafi et al., 2012).

4.8 Análise eletroforética de proteínas de células HeLa e MCF-7 expostas ao extrato de *A. absinthium*

Para observar a expressão de proteínas no citosol de células HeLa e MCF-7, foram realizadas duas eletroforeses SDS-PAGE, como descrito em 3.2.8. Os resultados da eletroforese para células HeLa encontram-se apresentados na Figura 4.18, em que foi analisada a expressão de proteínas das células HeLa tratadas apenas com meio de cultura RPMI 1640 suplementado (controlo) e expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($\text{IC}_{25} = 0,40 \text{ mg/mL}$) durante 48 horas, tendo estas últimas sido realizadas em duplicado.

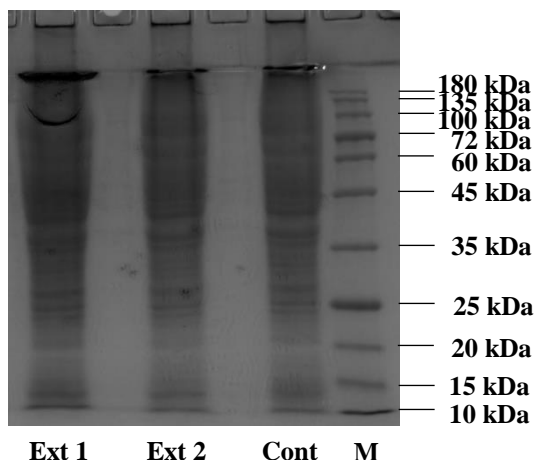


Figura 4.18: Eletroforese SDS-PAGE de amostras proteicas de células HeLa expostas a extrato de *A. absinthium* (Ext 1 e Ext 2) e de células controlo (Cont). Marcador de proteínas identificado com letra M (kDa). Ext 1, Ext 2 e Cont são provenientes de aproximadamente o mesmo número de células ($5,6 \times 10^4$ células). A imagem foi tratada no programa *ImageJ*.

Analisando a expressão proteica das amostras da Figura 4.18, pode observar-se que a expressão das proteínas existentes nas células HeLa expostas ao extrato aquoso da planta em estudo é semelhante às das células controlo (tratadas só com meio de cultura). A análise de densitometria das bandas das proteínas das células HeLa expostas ao extrato e das proteínas de células controlo é apresentada na Figura 4.19.

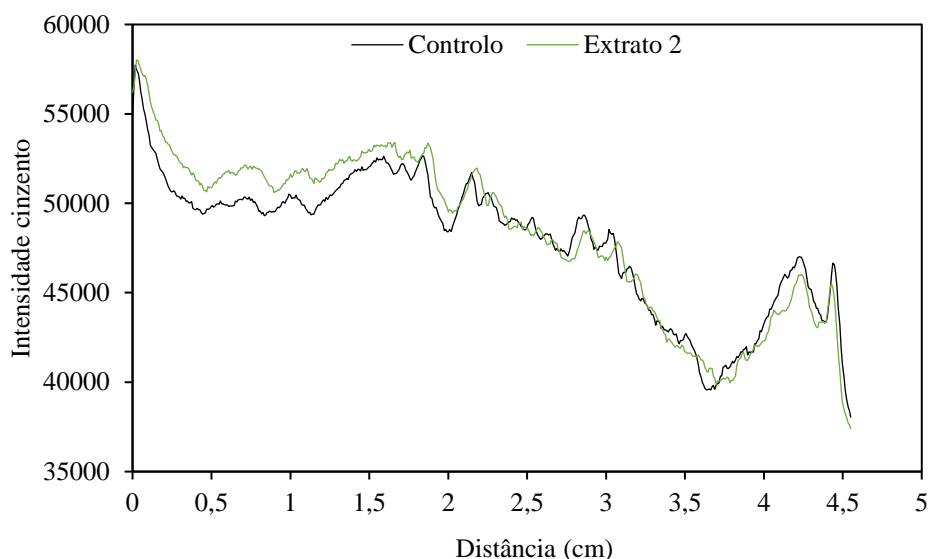


Figura 4.19: Densitometria da eletroforese SDS-PAGE de amostras proteicas de células HeLa expostas a extrato de *A. absinthium* (Extrato 2) e de células controlo.

Na Figura 4.19, observa-se que apesar dos perfis estarem deslocados parece que as intensidades das bandas das proteínas das células HeLa extrato são semelhantes às do controlo. Assim os resultados da Figura 4.18 e Figura 4.19, parecem sugerir que o extrato aquoso de *A. absinthium* não altera a expressão proteica no citosol de células HeLa.

No caso da análise eletroforética de proteínas do citosol de células MCF-7, foi analisada a expressão de proteínas das células tratadas apenas com meio de cultura RPMI 1640 suplementado (controlo) e expostas a extrato aquoso da planta ($IC_{20} = 0,35 \text{ mg/mL}$), tendo sido realizadas em duplicado, cujos resultados apresentam-se na Figura 4.20.

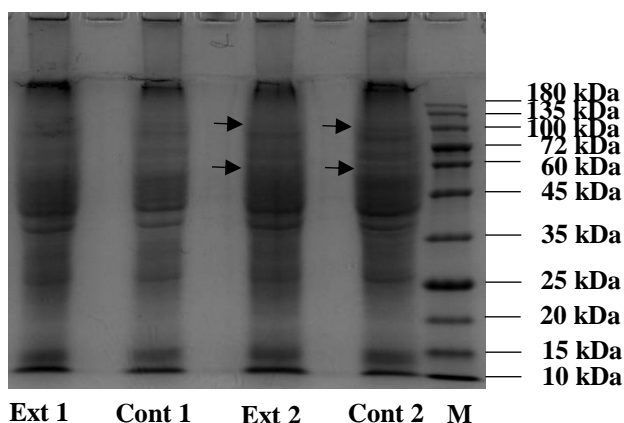


Figura 4.20: Eletroforese SDS-PAGE de amostras proteicas de células MCF-7 expostas a extrato de *A. absinthium* (Ext 1 e Ext 2) e de células controlo (Cont 1 e Cont 2). Marcador de proteínas identificado com letra M (kDa). Ext 1 e Cont 1 são provenientes de aproximadamente o mesmo número de células ($4,9 \times 10^4$ células); Ext 2 e Cont 2 são provenientes de $5,7 \times 10^4$ células. A imagem foi tratada no programa *ImageJ*. As setas na Figura indicam as bandas diferenciais observadas entre as amostras Ext 2 e Cont 2.

Ao analisar a expressão das proteínas das amostras Ext 2 e Cont 2 da Figura 4.20, que são amostras proteicas mais concentradas do que as Ext 1 e Cont 1 pois são provenientes de uma maior quantidade de células, observa-se que a expressão proteica nas células MCF-7 tratadas com extrato de *A. absinthium* é semelhante à das células controlo (tratadas com meio de cultura). Contudo pode visualizar-se uma ligeira diferença de duas bandas de proteínas, uma com peso molecular de

aproximadamente 100 kDa, com maior intensidade na amostra de controlo (Figura 4.20, poço Cont 2), e outra entre 45 e 60 kDa. Assim foi realizada uma análise de densitometria das bandas das proteínas das células MCF-7 expostas ao extrato e das proteínas de células controlo, que se encontra na Figura 4.21.

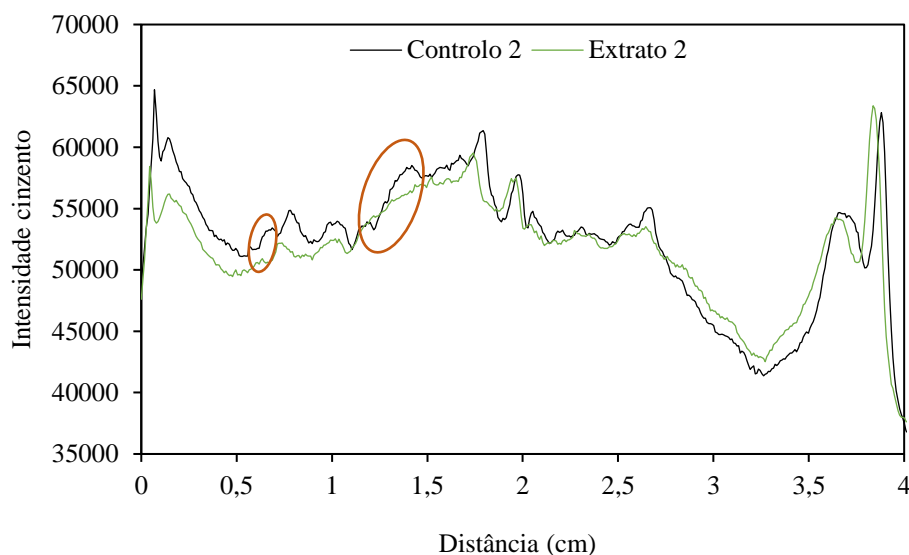


Figura 4.21: Densitometria da eletroforese SDS-PAGE de amostras proteicas de células MCF-7 expostas a extrato de *A. absinthium* (Extrato 2) e de células controlo (Controlo 2). Os círculos na Figura indicam as zonas diferenciais observadas entre as amostras Ext 2 e Cont 2.

Pela Figura 4.21, pode visualizar-se que apesar dos perfis estarem deslocados parece que a intensidade da maior parte das bandas das proteínas das células MCF-7 extrato são semelhantes às do controlo. Ainda assim, nas zonas indicadas pelos círculos ocorreu algumas alterações de intensidade das bandas entre as amostras de extrato e controlo. Deste modo os resultados da Figura 4.20 e Figura 4.21 sugerem que o extrato aquoso de *A. absinthium* pode estar a provocar pequenas alterações na expressão proteica no citosol de células MCF-7, contudo posteriormente foram também realizadas análises ao perfil proteico das células MCF-7, bem como das células HeLa, por HPLC-DAD (secção seguinte).

4.9 Análise de proteínas de células HeLa e MCF-7 expostas ao extrato de *A. absinthium* por HPLC-DAD

Para complementar os resultados obtidos na análise eletroforética de proteínas das linhas celulares HeLa e MCF-7, analisou-se também o perfil proteico de ambas as células por HPLC-DAD. No caso das células HeLa, tal como na análise eletroforética, foram analisadas as proteínas de células tratadas com meio de cultura (controlo) e de células expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL) durante 48 horas. As amostras proteicas analisadas por HPLC foram preparadas de acordo com o procedimento descrito em 3.2.9.1 e 3.2.9.2, tendo sido analisadas as amostras “sobrenadante acetona”, provenientes da precipitação de proteínas do citosol das células HeLa controlo e extrato (expostas ao extrato) com acetona, que foram ainda secas sob um fluxo de azoto e centrifugadas; as amostras “sobrenadante do precipitado proteico”, provenientes dos precipitados de proteínas das células, e as amostras da hidrólise de proteínas, provenientes da hidrólise dos precipitados proteicos com pepsina.

Assim os cromatogramas totais e parciais de HPLC-DAD obtidos do “sobrenadante acetona” provenientes da precipitação de proteínas de células HeLa controlo e extrato com acetona, estão apresentados na Figura 4.22, tal como o cromatograma da solução solvente de tampão de lise e acetona, que foram utilizados durante a preparação destas amostras.

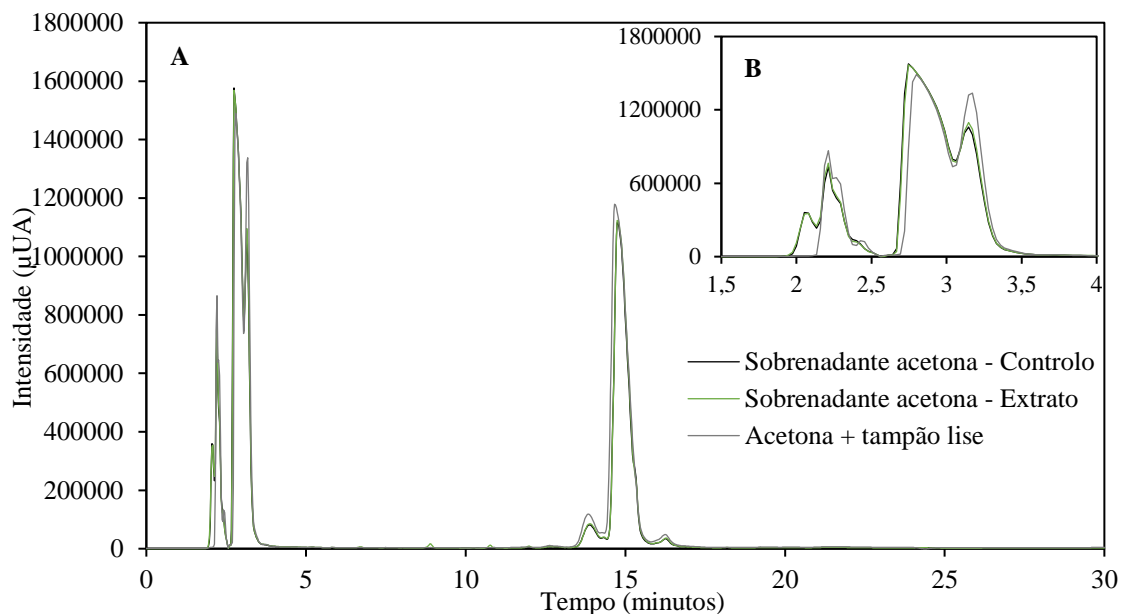


Figura 4.22: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) de sobrenadantes acetona da precipitação de proteínas de células HeLa controlo e expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL), e da solução de tampão de lise e acetona. A deteção foi realizada de 200 a 600 nm.

Os cromatogramas da Figura 4.22 dos sobrenadantes acetona foram obtidos para confirmar se a precipitação das proteínas das células HeLa controlo e extrato foi eficiente, e portanto se os sobrenadantes estão livres de proteína. A partir da Figura 4.22A e Figura 4.22B é possível observar que o cromatograma tanto do sobrenadante acetona da amostra controlo como o da amostra extrato são semelhantes ao da solução de tampão de lise e acetona, e sendo assim as proteínas das amostras ficaram nos precipitados proteicos. No entanto ao tempo de retenção de, aproximadamente, 2,1 minutos surge um pico com a mesma intensidade nos sobrenadantes acetona controlo e extrato (Figura 4.22B) que corresponde a uma proteína, ou parte dela, que ficou retida nestas amostras.

Seguidamente, encontram-se na Figura 4.23 os cromatogramas totais e parciais de HPLC-DAD obtidos para as amostras de sobrenadante do precipitado de proteínas de células HeLa controlo e extrato.

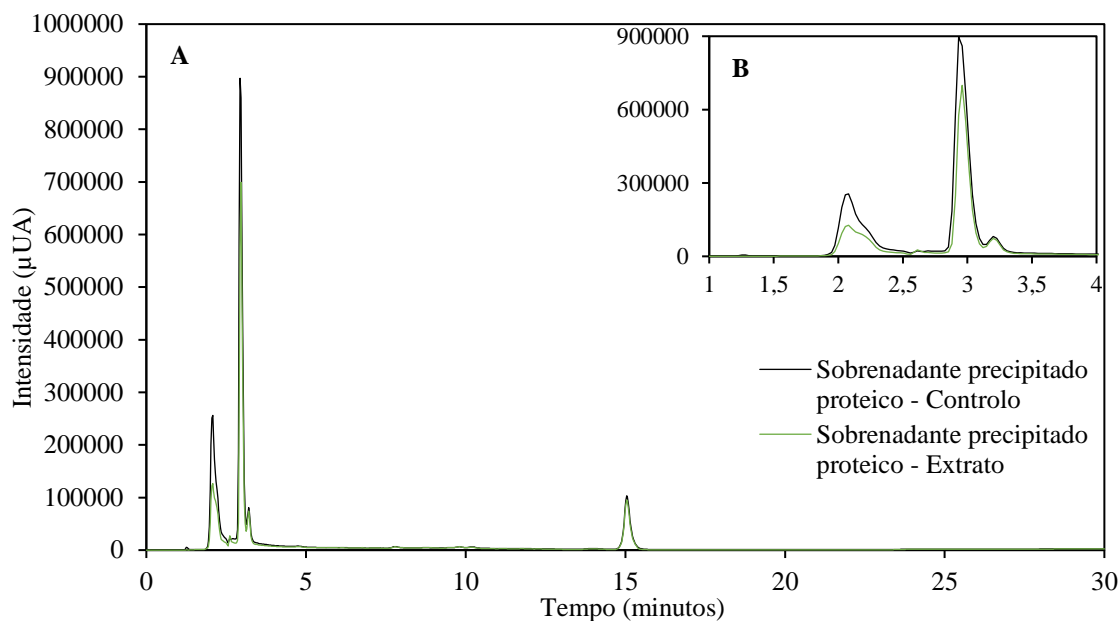


Figura 4.23: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) de sobrenadantes do precipitado de proteínas de células HeLa controlo e expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL). A deteção foi realizada de 200 a 600 nm.

A partir dos cromatogramas da Figura 4.23A e Figura 4.23B visualiza-se que existem alterações do perfil proteico das células HeLa quando estas são expostas ao extrato de *A. absinthium*. É possível apurar que o extrato aquoso da planta provocou variações na concentração das proteínas das células, diminuindo as proteínas que aparecem ao tempo de retenção (Tr) de, aproximadamente, 2,1 e 2,93 minutos (Figura 4.23B), e ainda diminuindo ligeiramente a proteína que surge ao Tr de 15,04 minutos (Figura 4.23A). Ainda assim foi analisar-se, se as alterações que estão a ocorrer nas proteínas das células na presença de extrato aquoso, eram mais visíveis e conclusivas nos péptidos provenientes da hidrólise das proteínas com pepsina, recorrendo novamente à análise por HPLC-DAD. Deste modo os cromatogramas totais e parciais obtidos da análise das amostras da hidrólise de proteínas de células HeLa controlo e extrato, apresentam-se na Figura 4.24.

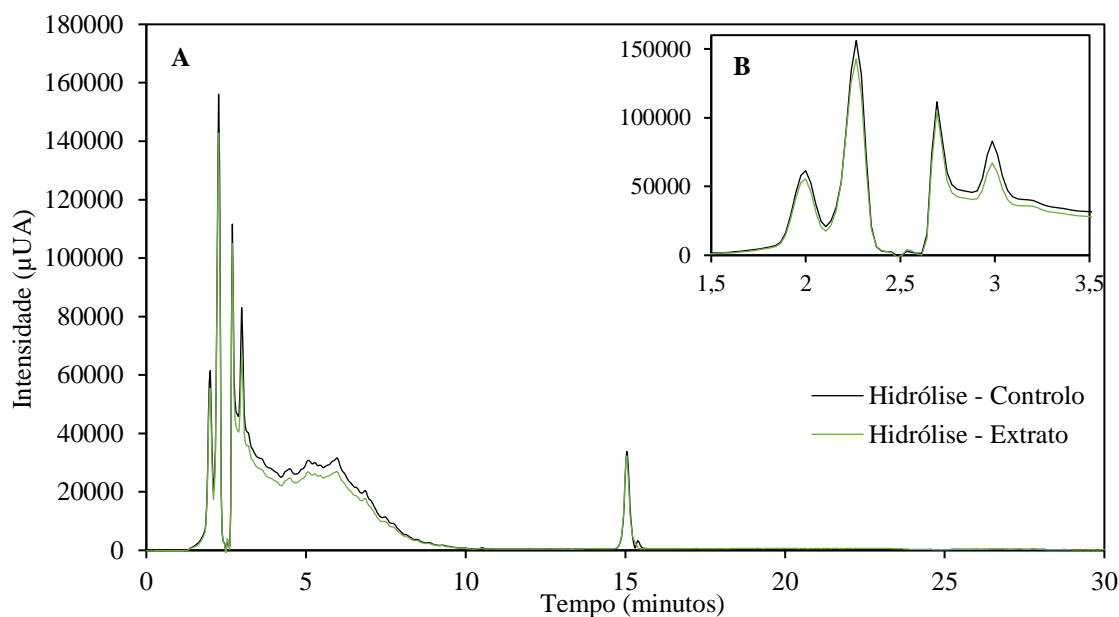


Figura 4.24: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) da hidrólise, com pepsina, de proteínas de células HeLa controle e expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL). A detecção foi realizada de 200 a 600 nm. Aos cromatogramas foi subtraído o controle de suco enzimático (pepsina) e água.

Ao visualizar a Figura 4.24A e Figura 4.24B observa-se que após a hidrólise das proteínas das células que estiverem na presença de extrato de *A. absinthium*, os péptidos resultantes detetados foram concordantes com os da hidrólise das proteínas controle e, tal como aconteceu nas proteínas, também ocorreram alterações ligeiras no seu teor. O extrato aquoso da planta provocou uma ligeira diminuição dos péptidos que surgiram ao Tr de aproximadamente, 2, 2,27, 2,69 e 2,99 minutos (Figura 4.24B) e ainda 15,04 minutos (Figura 4.24A). Comparando com os resultados obtidos anteriormente na Figura 4.23, conclui-se que o extrato aquoso de *A. absinthium* provoca alterações nas proteínas de células HeLa, no entanto era necessário realizar outras análises com métodos com maior resolução, como por eletroforese bidimensional, para analisar as proteínas alteradas.

Analisaram-se também perfis proteicos de células MCF-7, similarmente às células HeLa, controle (apenas tratadas com meio de cultura) e expostas a extrato aquoso da planta em estudo ($IC_{20} = 0,35$ mg/mL) durante 48 horas. Os cromatogramas totais e parciais das amostras do “sobrenadante acetona”, proveniente da precipitação das proteínas de células MCF-7 controle e extrato com acetona que foram ainda secas sob um fluxo de azoto, obtidos por HPLC-DAD, bem como o cromatograma da solução de tampão de lise e acetona, encontram-se na Figura 4.25.

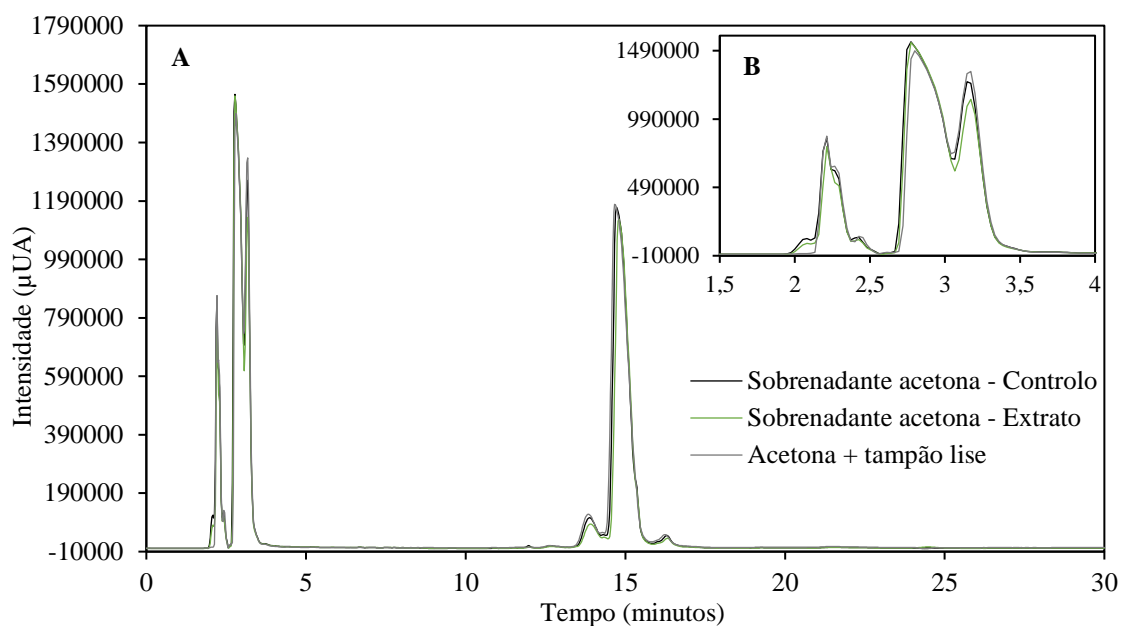


Figura 4.25: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) de sobrenadantes acetona da precipitação de proteínas de células MCF-7 controlo e expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{20} = 0,35$ mg/mL), e da solução de tampão de lise e acetona. A deteção foi realizada de 200 a 600 nm.

Pela Figura 4.25A e Figura 4.25B observa-se que os sobrenadantes tanto da amostra controlo como da amostra extrato foram semelhantes à solução de tampão de lise e acetona, e portanto estes sobrenadantes ficaram isentos de proteínas, apesar de ao tempo de retenção (T_r) de, aproximadamente, 2,1 minutos surgir um pico nos sobrenadantes acetona controlo e extrato (Figura 4.25B), correspondendo a uma proteína que ficou nestas amostras.

Posteriormente analisou-se as amostras de sobrenadante do precipitado de proteínas de células MCF-7 controlo e extrato, encontrando-se os respetivos cromatogramas totais e parciais, obtidos por HPLC-DAD, na Figura 4.26.

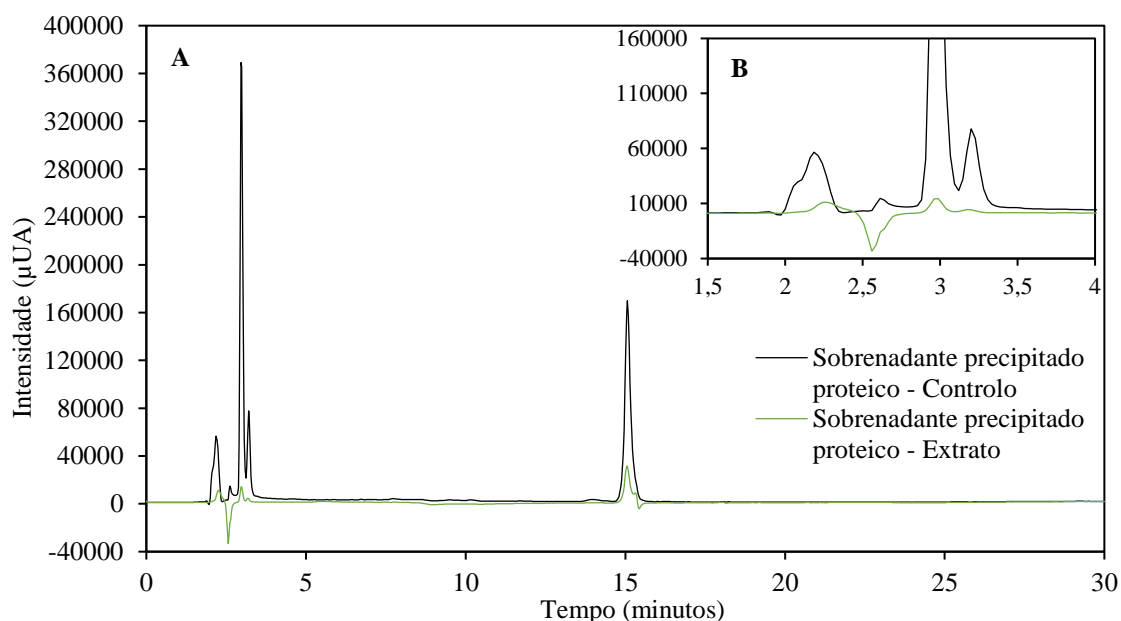


Figura 4.26: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) de sobrenadantes do precipitado de proteínas de células MCF-7 controlo e expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{20} = 0,35$ mg/mL). A deteção foi realizada de 200 a 600 nm.

Analisando a Figura 4.26A e Figura 4.26B, observa-se que estão a ocorrer alterações no perfil proteico das células MCF-7 quando estas estão na presença de extrato aquoso de *A. absinthium*. É possível que o extrato aquoso esteja a provocar uma diminuição das proteínas das células, como no caso das proteínas que surgem ao Tr de 2,96 minutos (Figura 4.26B) e de 15,07 minutos (Figura 4.26A), no entanto é difícil inferir se o extrato provocou as alterações proteicas até ao Tr de aproximadamente 2,96 minutos, uma vez que parece que a concentração proteica da amostra é baixa, sendo a detecção no HPLC baixa. De seguida foi verificar-se também por HPLC-DAD, as alterações que ocorrem nos péptidos provenientes da hidrólise das proteínas das células MCF-7 controlo e extrato, com pepsina, sendo que os cromatogramas totais e parciais resultantes estão na Figura 4.27.

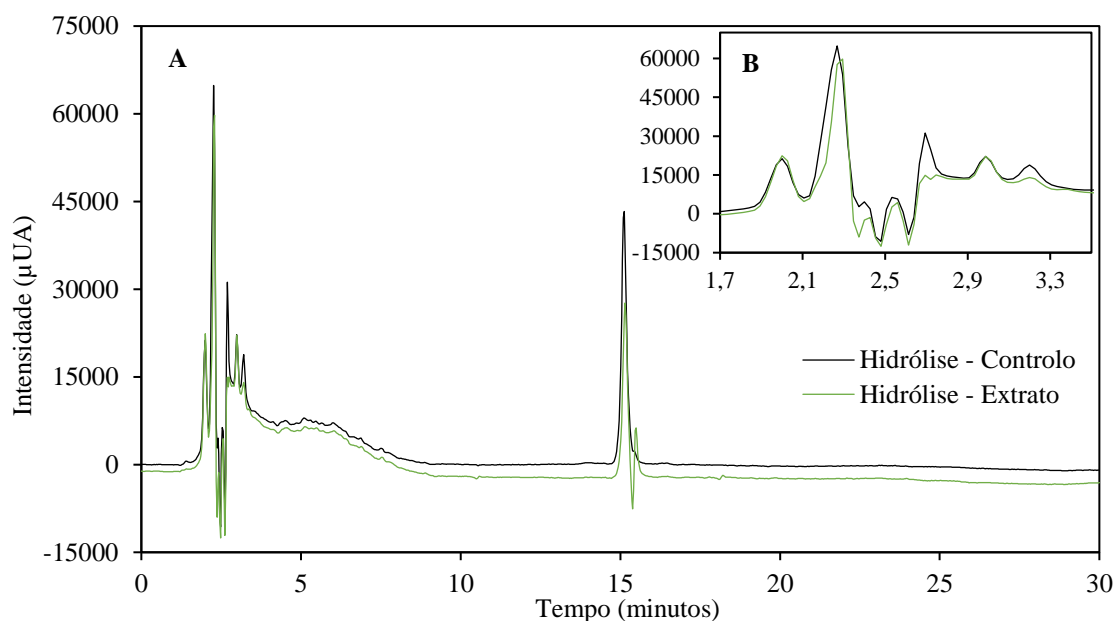


Figura 4.27: Cromatogramas de HPLC-DAD totais (A) e parciais (B) da hidrólise, com pepsina, de proteínas de células MCF-7 controlo e expostas a extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{20} = 0,35$ mg/mL). A detecção foi realizada de 200 a 600 nm. Aos cromatogramas foi subtraído o controlo de suco enzimático (pepsina) e água.

Através da Figura 4.27A e Figura 4.27B pode observar-se que da hidrólise das proteínas das células MCF-7 expostas ao extrato aquoso, resultam péptidos concordantes com os originários da hidrólise das proteínas de células controlo, sendo que a concentração de alguns deles alterou-se. A presença do extrato de *A. absinthium* nas células provocou uma diminuição dos péptidos que surgiram ao Tr de 2,69 minutos (Figura 4.27B) e 15,12 minutos (Figura 4.27A), e uma ligeira diminuição dos que surgiram ao Tr de 2,27 e de 3,2 minutos. Já ao tempo de retenção de 2 e 2,99 minutos os péptidos não sofreram alterações. Assim sendo pode constatar-se que o extrato aquoso de *A. absinthium* provoca algumas alterações proteicas nas células MCF-7, porém, tal como foi referido na análise da linha celular HeLa, estes estudos poderão ser prosseguidos com a identificação das proteínas que estão alteradas.

Em conclusão, o extrato aquoso de *A. absinthium* em concentrações de baixa toxicidade causa alterações às células HeLa e MCF-7, que foram observadas por apresentarem perfis alterados de proteínas, na análise por HPLC e no caso de células MCF-7 também por eletroforese, e perfis alterados de metabolitos, na análise por FTIR.

4.10 Ação do extrato de *A. absinthium* na citotoxicidade do fármaco cisplatina em células HeLa

Atualmente, um dos métodos mais usados para o tratamento do cancro é a quimioterapia, usando-se para isso substâncias como cisplatina, um agente anticancerígeno que tem potencial para causar morte celular pela indução de apoptose (Minagawa et al., 1999). Como os fármacos quimioterapêuticos não garantem 100% de eficácia, alguns pacientes recorrem também ao uso de recursos naturais, como as plantas medicinais, consumindo infusões ou decocções destas plantas durante o tratamento por quimioterapia. Assim neste trabalho pretendeu-se investigar a citotoxicidade da combinação de cisplatina e extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL) na linha celular humana de adenocarcinoma HeLa, de modo a avaliar se a presença deste poderia ser uma mais valia juntamente com a cisplatina para a quimioterapia. Para tal avaliou-se também a citotoxicidade apenas de cisplatina sozinha e da combinação de cisplatina com o padrão ácido clorogénico ($50 \mu\text{M}$) nas células. O estudo da citotoxicidade foi realizado usando o ensaio do MTT, como descrito na secção 3.2.6.2.

A viabilidade das células HeLa tratadas com os compostos em estudo, foi obtida como descrito em 3.2.6.2, e através do tratamento dos resultados obtiveram-se os valores finais de viabilidade das células, representados na Figura 4.28.

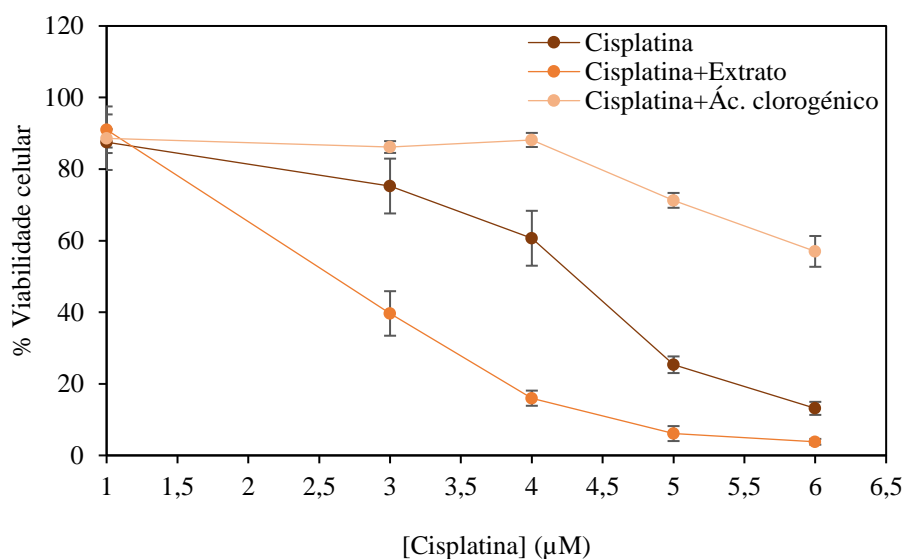


Figura 4.28: Viabilidade celular (%) de células HeLa na presença de concentrações crescentes de cisplatina sozinha, cisplatina juntamente com extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL) e cisplatina juntamente com padrão ácido clorogénico ($50 \mu\text{M}$). Valores finais de viabilidade com d.p. de 6×2 replicados.

Como mostra a Figura 4.28, verificam-se diferenças na sensibilidade das células HeLa à cisplatina sozinha e em combinação com extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL) ou com padrão ácido clorogénico ($50 \mu\text{M}$). Pode confirmar-se que a cisplatina induz a redução da viabilidade da linha celular HeLa para as concentrações do fármaco testadas, e que a combinação de cisplatina e extrato aquoso de *A. absinthium*, quando comparada com o fármaco sozinha, provoca uma redução mais acentuada da viabilidade celular, portanto um aumento da citotoxicidade. Contrariamente, a combinação de cisplatina com padrão ácido clorogénico, quando comparada com o fármaco sozinha, mostra que a viabilidade das células HeLa se mantém até à concentração de $4 \mu\text{M}$ e que a partir daí a viabilidade é menos afetada, por isso o ácido clorogénico reduz o efeito citotóxico da cisplatina. Pode também verificar-se que a combinação de cisplatina e extrato aquoso da planta em comparação com a

combinação de cisplatina com o padrão ácido clorogénico, apresenta uma grande redução de viabilidade celular.

Deste modo os resultados sugerem que a presença do extrato aquoso da decocção da planta durante a quimioterapia com a cisplatina, potencie o efeito citotóxico da cisplatina.

Para investigar se o aumento da citotoxicidade observado para a combinação citotóxica entre a cisplatina e o extrato aquoso de *A. absinthium* é reproduzido num outro agente citotóxico, realizou-se uma combinação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) exógeno com extrato aquoso, funcionando esta combinação como controlo de *stress* oxidativo. O H_2O_2 exógeno é frequentemente aplicado como espécie reativa de oxigénio (ROS) representativo na modelação do *stress* oxidativo na célula (Park, 2014). Assim sendo a citotoxicidade da combinação entre H_2O_2 e o extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL), foi avaliada na linha celular HeLa através do teste de viabilidade do MTT (como descrito em 3.2.6.2), bem como a citotoxicidade apenas de H_2O_2 sozinho e da combinação de H_2O_2 com o padrão ácido clorogénico ($50 \mu M$). Depois de obtida a viabilidade das células HeLa tratadas com estes compostos, como descrito na secção 3.2.6.2, e através do tratamento dos dados obtiveram-se os valores finais de viabilidade das células, representados na Figura 4.29.

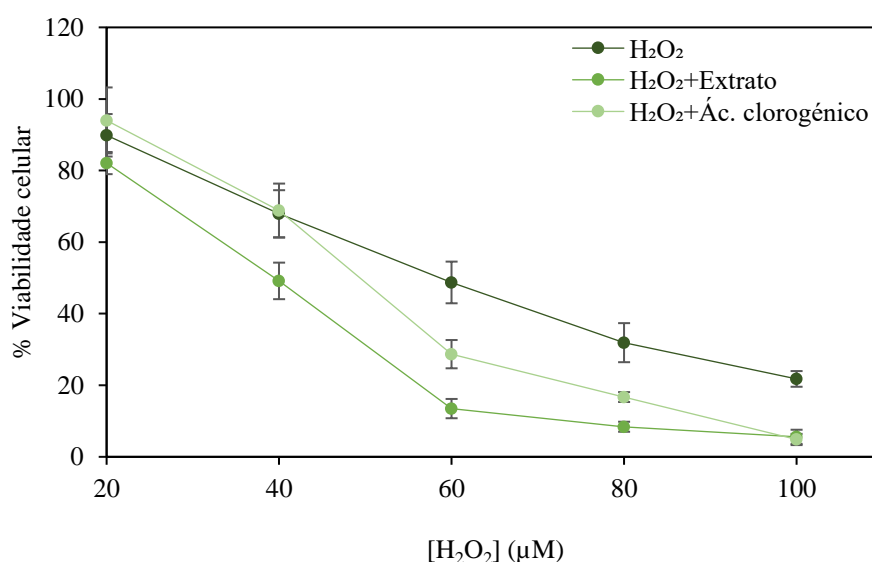


Figura 4.29: Viabilidade celular (%) de células HeLa na presença de concentrações crescentes de H_2O_2 sozinho, H_2O_2 juntamente com extrato aquoso de *A. absinthium* ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL) e H_2O_2 juntamente com padrão ácido clorogénico ($50 \mu M$). Valores finais de viabilidade com d.p. de 6×2 replicados.

A Figura 4.29 mostra que o H_2O_2 induz a diminuição da viabilidade da linha celular HeLa, para as concentrações do composto testadas, e que a combinação entre o H_2O_2 e o extrato aquoso da planta ($IC_{25} = 0,40$ mg/mL), quando comparada com o composto sozinho, provoca uma maior redução da viabilidade celular. Já a combinação de H_2O_2 com o padrão ácido clorogénico ($50 \mu M$), quando comparada com o composto sozinho, mostra que a viabilidade das células HeLa se mantém semelhante até à concentração de $40 \mu M$ e que a partir dessa a viabilidade reduz mais, indicando que o ácido clorogénico aumenta o efeito tóxico de H_2O_2 . Apesar do ácido clorogénico ser normalmente considerado antioxidante e ter efeitos protetores contra o *stress* oxidativo causado por agentes indutores de *stress* oxidativo (Tsuchiya et al., 1996), outros autores já verificaram que o ácido clorogénico em elevadas concentrações pode também estar relacionado com indução de fenómenos relacionados com *stress* oxidativo (Du et al., 2013).

Verifica-se ainda que a combinação de H_2O_2 e extrato da planta em comparação com a combinação de H_2O_2 com o padrão ácido clorogénico, apresenta uma maior redução de viabilidade

celular. Estes resultados podem sugerir que o extrato aquoso da decocção da planta quando combinado com H_2O_2 , promove o aumento do efeito de *stress* oxidativo nas células testadas, possivelmente por ter na sua composição vários compostos da mesma família do ácido clorogénico, incluindo cinarina e os seus isómeros.

Os valores de IC_{50} (μM) foram determinados tanto para as combinações de cisplatina e de H_2O_2 , bem como para os compostos sozinhos, na linha celular em estudo (Tabela 4.8), através das regressões lineares com a viabilidade (%) (de 6×2 replicados) em função das concentrações crescentes dos compostos em estudo.

Tabela 4.8: Citotoxicidade de vários compostos em células HeLa. Valores de IC_{50} (μM) \pm d.p. de 6×2 replicados.

Linha celular	Compostos	IC_{50} (μM)
HeLa	Cisplatina	$4,28 \pm 0,19^a$
	Cisplatina+Extrato	$2,75 \pm 0,16^b$
	Cisplatina+Ác. clorogénico	$7,08 \pm 0,42^c$
	H_2O_2	$63,43 \pm 4,97^A$
	H_2O_2 +Extrato	$41,37 \pm 1,96^B$
	H_2O_2 +Ác. clorogénico	$51,82 \pm 1,89^C$

Letras minúsculas diferentes correspondem a valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) no grupo de cisplatina; Letras maiúsculas diferentes correspondem a valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) no grupo de H_2O_2 .

Como se pode observar pela Tabela 4.8, uma concentração baixa de cisplatina sozinha ($4,28 \pm 0,19 \mu M$) diminui em 50% a viabilidade das células HeLa, por indução de apoptose, sendo que o valor obtido não foi muito semelhante ao valor da literatura de IC_{50} relatado por Tardito et al. (2009), de $13 \mu M$ nas mesmas células, e com a mesma duração da exposição ao fármaco (48 horas, sendo que a viabilidade foi avaliada com o ensaio de resazurina). Por outro lado, o IC_{50} de cisplatina em combinação com extrato aquoso de *A. absinthium* ($0,40 \text{ mg/mL}$) foi menor ($IC_{50} = 2,75 \pm 0,16 \mu M$) do que cisplatina sozinha, resultando num aumento de aproximadamente 1,6 vezes de citotoxicidade de cisplatina quando comparado com cisplatina sozinha. Assim este valor de IC_{50} indica que a presença de extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* em combinação com cisplatina, melhora a resposta citotóxica da cisplatina na linha celular testada e que o extrato potencializou esse efeito citotóxico.

O efeito combinado de cisplatina e de ácido clorogénico ($50 \mu M$) na linha celular HeLa, resultou num valor de IC_{50} mais alto ($7,08 \pm 0,42 \mu M$) do que cisplatina sozinha, representando uma perda de citotoxicidade para a cisplatina na presença de ácido clorogénico, e portanto este tem um efeito citoprotetor para a cisplatina. Outros autores já reportaram o efeito citoprotetor de ácido clorogénico contra a toxicidade induzida por outros fármacos em linhas celulares normais (Chlopčíková et al., 2004).

Pela Tabela 4.8 pode também verificar-se que os efeitos de H_2O_2 exógeno sobre as células HeLa resultaram num valor de IC_{50} de $63,43 \pm 4,97 \mu M$, sendo que o valor obtido não foi muito semelhante ao valor da literatura de IC_{50} relatado por Park (2014), de aproximadamente $75 \mu M$ nas mesmas células, mas com uma duração da exposição ao fármaco de 24 horas. Já o IC_{50} da combinação de H_2O_2 com extrato aquoso de *A. absinthium* ($0,40 \text{ mg/mL}$) foi mais baixo ($IC_{50} = 41,37 \pm 1,96 \mu M$) do que H_2O_2 sozinho, que resultou num aumento de aproximadamente 1,5 vezes de citotoxicidade de H_2O_2 quando comparado com H_2O_2 sozinho, indicando isto que a presença do extrato aquoso potencializou o efeito de *stress* oxidativo. Por outro lado, o H_2O_2 em combinação com ácido clorogénico ($50 \mu M$) levou também à diminuição do IC_{50} ($IC_{50} = 51,82 \pm 1,89 \mu M$) quando comparado com H_2O_2 sozinho, no entanto este aumento de citotoxicidade de H_2O_2 combinado com ácido clorogénico é menos provável, devido à citotoxicidade do ácido clorogénico, que se mostra inexistente tal como foi observado na secção 4.6. No entanto já foi verificado que o ácido clorogénico em elevadas concentrações pode também estar

relacionado com indução de fenómenos relacionados com *stress* oxidativo (Du et al., 2013), o que pode explicar este resultado.

Pode-se concluir pelos resultados acima descritos que no presente estudo o efeito citoprotetor de ácido clorogénico para a cisplatina não deverá estar relacionado com o *stress* oxidativo, mas pode estar relacionado com o próprio mecanismo de ação da cisplatina.

Os resultados observados também indicam que o extrato aquoso aumenta o efeito tóxico da cisplatina, ao contrário do padrão ácido clorogénico, que poderá ser explicado pelo facto do extrato ser constituído por outros compostos fenólicos para além do ácido clorogénico, como por exemplo a apigenina-6,8-di-*C*-glucósido (vicenina-2), que podem ter uma ação diferente e contribuir para o efeito citotóxico observado. Foi demonstrado no estudo por Nagaprashantha et al. (2011), evidências de que a vicenina-2 aumentou o efeito tóxico de docetaxel, outro fármaco anticancerígeno.

Os resultados também indicam que o aumento do efeito de *stress* oxidativo do H₂O₂ provocado pelo extrato aquoso foi semelhante ao efeito provocado pelo ácido clorogénico, podendo ser devido aos vários compostos da mesma família do ácido clorogénico, incluindo cinarina e os seus isómeros, presentes no extrato.

Determinou-se também concentrações sub-tóxicas dos compostos em estudo sozinhos e combinados com extrato aquoso ou ácido clorogénico, para continuar os ensaios posteriores com a linha celular (espectroscopia de FTIR). Para isso obteve-se a concentração de cisplatina sozinha e cisplatina em combinação com ácido clorogénico (50 µM) que provoca apenas uma diminuição de aproximadamente 20% da viabilidade celular (IC₂₀) na linha celular HeLa, 2,98 ± 0,33 µM e 3,77 ± 0,14 µM, respetivamente, e a concentração de cisplatina em combinação com extrato (0,40 mg/mL) que provoca diminuição de 7% da viabilidade celular (IC₇), 0,92 ± 0,13 µM. Obteve-se também o valor de IC₂₀ para H₂O₂ sozinho e H₂O₂ combinado com ácido clorogénico, 31,88 ± 2,94 µM e 31,26 ± 3,01 µM, respetivamente e o valor de IC₇ para H₂O₂ combinado com extrato, 8,46 ± 0,31 µM.

4.11 Detecção de alterações bioquímicas em células HeLa por efeito do extrato de *A. absinthium* na ação da cisplatina, por espectroscopia de FTIR

Foram detetadas por espectroscopia de FTIR alterações da composição bioquímica de células HeLa após o tratamento com a combinação entre o fármaco cisplatina e IC₂₅ do extrato aquoso da decocção de *A. absinthium* (IC₇ = 0,92 µM), avaliando-se também as alterações das células expostas a cisplatina sozinha (IC₂₀ = 2,98 µM), e da combinação de cisplatina com 50 µM do padrão ácido clorogénico (IC₂₀ = 3,77 µM). Investigou-se ainda como controlo de *stress* oxidativo a combinação de H₂O₂ exógeno com extrato aquoso (IC₇ = 8,46 µM), e ainda o H₂O₂ sozinho (IC₂₀ = 31,88 µM) e a combinação de H₂O₂ com o padrão ácido clorogénico (IC₂₀ = 31,26 µM). A análise das alterações nas células HeLa foi realizada como descrito na secção 3.2.7.2. As bandas de absorção de FTIR usadas na análise foram as mesmas mencionadas na secção 4.7 na análise de células HeLa secas, e descritas na Tabela 4.7. Os espectros de FTIR resultantes da análise de células HeLa secas, tanto controlo (sem tratamento), como expostas aos compostos em estudo, encontram-se representados na Figura 4.30.

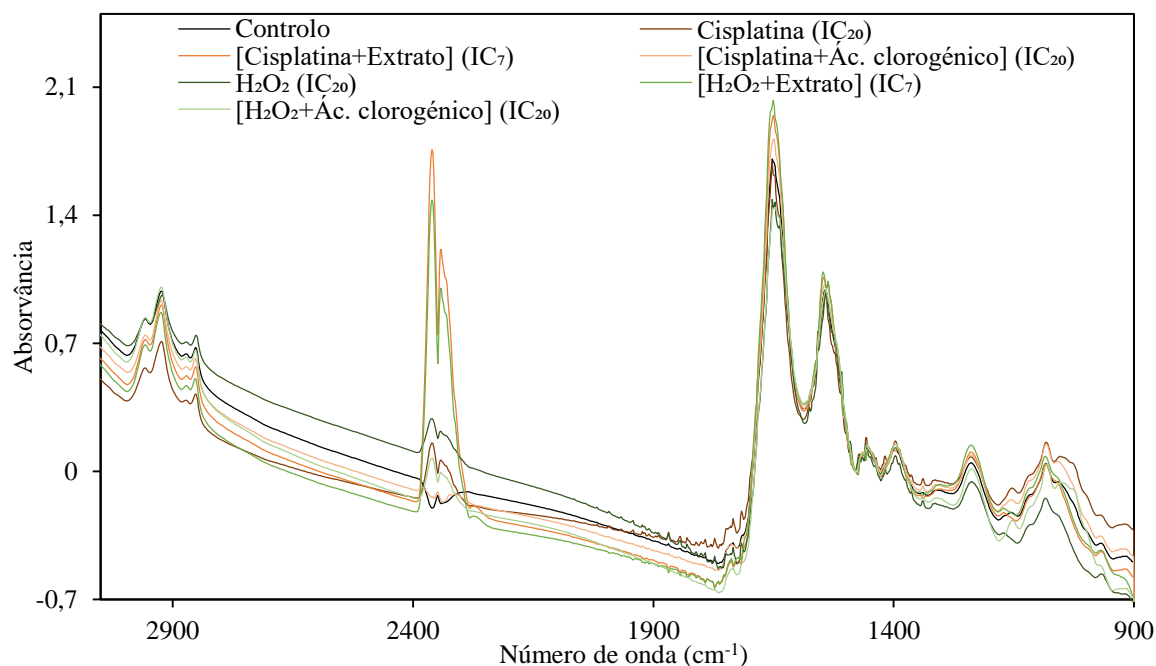


Figura 4.30: Espectros médios de FTIR de células HeLa controlo (sem tratamento, apenas em meio), células HeLa expostas a cisplatina sozinha ($IC_{20} = 2,98 \mu M$), expostas a cisplatina combinada com IC_{25} extrato de *A. absinthium* ($IC_7 = 0,92 \mu M$), expostas a cisplatina combinada com $50 \mu M$ ácido clorogénico ($IC_{20} = 3,77 \mu M$), expostas a H_2O_2 sozinha ($IC_{20} = 31,88 \mu M$), expostas H_2O_2 combinado com IC_{25} extrato de *A. absinthium* ($IC_7 = 8,46 \mu M$) e expostas a H_2O_2 combinado com $50 \mu M$ ácido clorogénico ($IC_{20} = 31,26 \mu M$). Os espectros são a média de três medições e no caso do controlo, de 3x5 medições. Os espectros individuais usados para os espectros médios foram normalizados pela altura do pico da Amida II na região de 1541 e 1479 cm^{-1} .

Na Figura 4.30 observa-se as variações espectrais nos espectros médios de FTIR de células HeLa tratadas com os compostos testados e de células HeLa controlo. É de evidenciar que o fármaco cisplatina não apresenta espectro de FTIR que se sobrepõe às regiões analisadas nos espectros de FTIR de células, mesmo na concentração que assume que o composto é retido no interior das células (ver Anexo K).

Foram calculadas através de razões entre as principais bandas de absorção dos espectros de FTIR da Figura 4.30 e discutidas na Tabela 4.7, as alterações químicas que ocorreram nas células HeLa expostas aos compostos em estudo. O cálculo destas razões foi realizado da mesma forma descrita na seção 4.7 - “Detecção de alterações bioquímicas em células HeLa e MCF-7 após exposição ao extrato aquoso de *A. absinthium*, por FTIR”, para células HeLa. Assim foram obtidas as razões médias de $\nu_{as}(CH_3)/Amida II$, $\nu_{as}(CH_2)/Amida II$, $\nu_{as}(CH_2)/\nu_{as}(CH_3)$, $\nu(C=O)/Amida II$, $\nu(C=O)/\nu_{as}(CH_2)$ e $\nu_s(PO_2^-)/Amida II$, para as células HeLa tratadas com os compostos em estudo, e para células HeLa controlo, sendo que no caso do controlo as razões médias foram realizadas com quinze valores normalizados, que correspondem aos ensaios realizados com os compostos estudados. Estes resultados encontram-se apresentados na Figura 4.31.

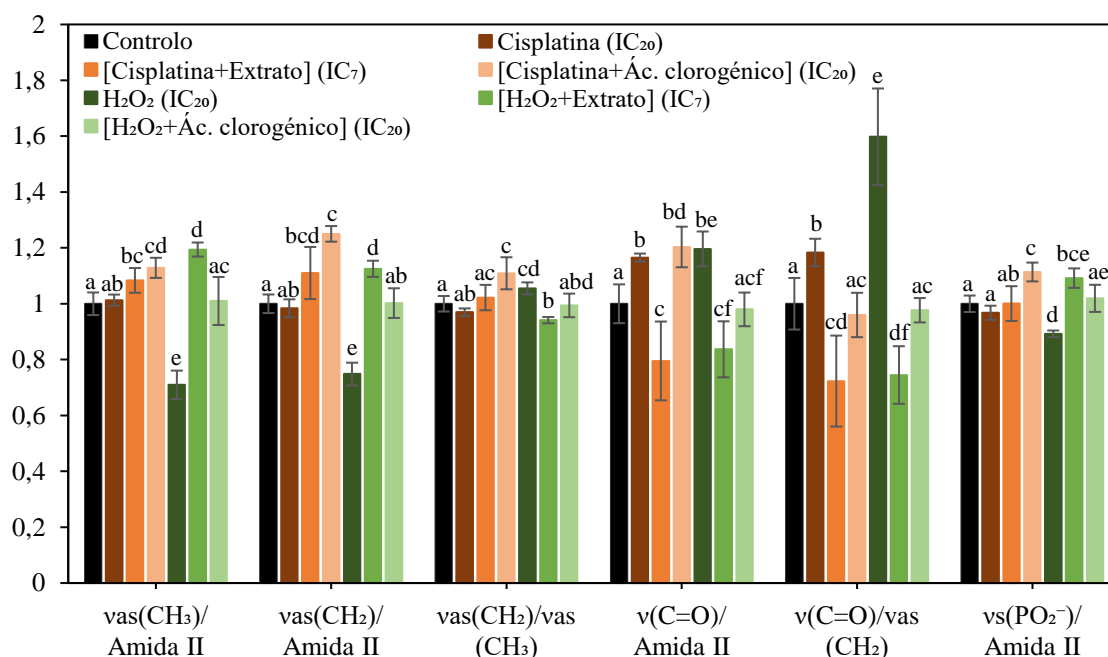


Figura 4.31: Razões médias das bandas de absorção dos espectros de FTIR de células HeLa controlo (sem tratamento, apenas em meio) e de células HeLa expostas a cisplatina sozinha (IC₂₀ = 2,98 µM), expostas a cisplatina combinada com IC₂₅ extrato de *A. absinthium* (IC₇ = 0,92 µM), expostas a cisplatina combinada com 50 µM ácido clorogénico (IC₂₀ = 3,77 µM), expostas a H₂O₂ sozinha (IC₂₀ = 31,88 µM), expostas H₂O₂ combinado com IC₂₅ extrato de *A. absinthium* (IC₇ = 8,46 µM) e expostas a H₂O₂ combinado com 50 µM ácido clorogénico (IC₂₀ = 31,26 µM). ^{a-f}Letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) para a mesma razão.

Pelas razões representadas na Figura 4.31 é possível observar as variações que ocorrem na linha celular HeLa, dos componentes químicos, após 48 horas de exposição das células à cisplatina sozinha (IC₂₀ = 2,98 µM), ou à combinação de cisplatina com IC₂₅ de extrato aquoso de *A. absinthium* (IC₇ = 0,92 µM de cisplatina) ou com 50 µM de padrão ácido clorogénico (IC₂₀ = 3,77 µM de cisplatina), quando comparadas com células HeLa controlo (sem tratamento), ou entre si. Também se verificou as variações moleculares quando células HeLa são expostas a H₂O₂ sozinha (IC₂₀ = 31,88 µM), ou à combinação de H₂O₂ com IC₂₅ de extrato de *A. absinthium* (IC₇ = 8,46 µM de H₂O₂) ou com 50 µM de padrão ácido clorogénico (IC₂₀ = 31,26 µM de H₂O₂), quando comparadas com o controlo, ou entre si.

No gráfico da Figura 4.31 pode verificar-se pela razão $v_{as}(CH_3)/Amida II$, que em células HeLa tratadas com cisplatina em comparação com células controlo, que não existem alterações significativas, ou seja, permanece inalterada a quantidade de grupos CH₃ das cadeias acil dos lípidos relativamente à quantidade de proteína na célula, sugerindo que não há variações na quantidade de lípidos. Já em células tratadas com H₂O₂ sozinha comparadas com células controlo houve uma diminuição dessa razão, propondo assim que diminuiu a quantidade de lípidos na célula. Em relação à razão $v_{as}(CH_2)/Amida II$, em células HeLa tratadas com cisplatina sozinha quando comparadas com células controlo, observa-se que não existem alterações significativas, ou seja, permanece inalterada a quantidade de grupos CH₂ das cadeias acil dos lípidos relativamente à quantidade de proteína na célula, sugerindo que não há variações no comprimento das cadeias lipídicas relativamente à quantidade proteica. Em células tratadas com H₂O₂ sozinha comparadas com células controlo, ocorreu diminuição dessa razão, isto é, diminuição das cadeias lipídicas relativamente à quantidade proteica, que pode ser devido à diminuição da quantidade de lípidos. Relativamente à razão $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$ não foram observadas alterações significativas em células expostas à cisplatina sozinha, em relação às células controlo, isto é, permanece inalterado o teor de grupos CH₂ de cadeias acil dos lípidos em relação a grupos CH₃ das mesmas, dando a sugerir que não houve alteração do comprimento das cadeias acil lipídicas. Nas células tratadas com H₂O₂ sozinha

comparadas com células controlo, houve aumento do comprimento das cadeias acil lipídicas que é sugerido pelo aumento da razão, que pressupõe alteração na composição dos lípidos totais.

Já ao nível das razões $\nu(\text{C=O})/\text{Amida II}$ e $\nu(\text{C=O})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, ocorreram alterações significativas nas células HeLa provocadas pelo efeito tanto da cisplatina sozinha, como de H_2O_2 , quando comparadas com células controlo. Assim tanto com cisplatina ou com H_2O_2 , ocorreu aumento das razões abordadas, levando a crer que grupos C=O do éster dos fosfolípidos aumentaram em relação ao teor de proteína na célula, e em relação à quantidade de grupos CH_2 das cadeias acil lipídicas na célula, o que revela um aumento da quantidade de fosfolípidos na célula e em relação ao teor de outras classes de lípidos.

Na razão $\nu_s(\text{PO}_2^-)/\text{Amida II}$, não se observaram alterações significativas em células expostas à cisplatina sozinha em comparação com o controlo, o que revela que permanece inalterado o teor de grupos fosfato de ácidos nucleicos em relação ao teor de proteína na célula, sugerindo por isso que não houve alteração da quantidade de ácidos nucleicos na célula. Já em células tratadas com H_2O_2 comparadas com células controlo houve uma diminuição da razão, que sugere a diminuição da quantidade de ácidos nucleicos na célula.

Os resultados descritos acima sugerem que, uma vez que em células HeLa tratadas com cisplatina sozinha, em comparação com células controlo, é verificado o aumento de fosfolípidos de membrana celular, pode estar a ocorrer formação de vesículas em consequência de morte celular por apoptose. Sabe-se que o aumento da absorvância de C=O do éster dos fosfolípidos pode ser explicado pelas alterações da membrana celular associadas ao processo de apoptose, como a exposição à fosfatidilserina (um fosfolípido) e o desenvolvimento de membrana para formação de vesículas (Wu et al., 2015). Já o efeito do *stress* oxidativo provocado pelo H_2O_2 nas células, levou à diminuição de ácidos nucleicos, por poder estar a haver hidrólise destes, mas também ocorreu um aumento da quantidade de fosfolípidos, indicando que pode estar a levar à morte celular por apoptose. Durante o processo de apoptose ocorrem alterações morfológicas como a clivagem de DNA nuclear e formação de corpos apoptóticos ligados à membrana que expõem a fosfatidilserina nas camadas externas das membranas plasmáticas (Chowdhury et al., 2006).

Na Figura 4.31, relativamente à razão $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)/\text{Amida II}$, em células que foram expostas à cisplatina combinada com extrato de *A. absinthium*, quando comparadas com o controlo, verificou-se que houve um aumento significativo da razão, que sugere um aumento de lípidos por quantidade de proteína nas células. Comparando as células tratadas com a combinação de cisplatina e extrato com células tratadas apenas com cisplatina sozinha, não há alterações significativas, indicando que a quantidade de lípidos nas células permanece inalterada. Já em células expostas ao H_2O_2 combinado com extrato, comparadas com o controlo, ocorreu um aumento de lípidos por quantidade de proteína nas células, sugerido pelo aumento significativo da razão. O mesmo acontece a células expostas ao H_2O_2 combinado com extrato, comparadas com células tratadas com H_2O_2 sozinho.

Na razão $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\text{Amida II}$, em células que foram expostas à cisplatina combinada com extrato de *A. absinthium*, quando comparadas com o controlo, verificou-se que houve um aumento significativo da razão, que sugere um aumento das cadeias lipídicas relativamente à quantidade proteica. Comparando ainda células tratadas com a combinação de cisplatina e extrato, com células tratadas apenas com cisplatina sozinha, não há alterações significativas ($P = 0,091$), indicando que permanece inalterado o comprimento das cadeias lipídicas relativamente à quantidade proteica. Em células tratadas com H_2O_2 combinado com extrato, comparadas com o controlo, houve um aumento da razão, sugerindo um aumento das cadeias lipídicas relativamente ao teor de proteína, observando-se o mesmo quando comparando com células tratadas com H_2O_2 sozinho.

Em relação à razão $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ não foram observadas alterações significativas em células expostas à cisplatina combinada com extrato, quando comparadas com o controlo, ou quando comparadas com cisplatina sozinha, ou seja, não há alterações do comprimento das cadeias acil lipídicas. Em células tratadas com H_2O_2 combinado com extrato, comparadas com o controlo, ou comparadas com

com H_2O_2 sozinho, ocorreu uma diminuição desta razão, sugerindo que houve diminuição do comprimento das cadeias acil lipídicas, sugerindo uma alteração na composição dos lípidos totais.

Ao nível das razões $\nu(\text{C}=\text{O})/\text{Amida II}$ e $\nu(\text{C}=\text{O})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ocorreram alterações significativas em células HeLa provocadas pelo efeito da cisplatina combinada com extrato aquoso, quando comparadas com células controlo, ou, comparadas com células expostas à cisplatina sozinha. Nestes casos houve diminuição das razões, o que pressupõe a redução da quantidade de fosfolípidos na célula e relativamente ao teor de outras classes de lípidos. O mesmo aconteceu nessas razões para células expostas a H_2O_2 combinado com extrato, quando comparadas com células controlo, ou, comparadas com células expostas a H_2O_2 sozinho.

Na razão $\nu_s(\text{PO}_2^-)/\text{Amida II}$, não se observaram alterações significativas em células expostas à cisplatina combinada com extrato aquoso, em comparação com o controlo, ou em comparação com cisplatina sozinha, o que sugere que não houve alteração da quantidade de ácidos nucleicos na célula. No caso de células tratadas com H_2O_2 combinado com extrato, comparadas com o controlo, ou comparadas com H_2O_2 sozinho, ocorreu aumento da razão, que sugere o aumento de ácidos nucleicos na célula. O aumento de ácidos nucleicos pode ser devido a aumento de expressão genética (aumento de RNA) ou paragem do ciclo celular durante ou após replicação do DNA.

Os resultados descritos a cima, sugerem que a presença de extrato aquoso em combinação com cisplatina provoca alterações na composição química das células diferentes da cisplatina sozinha, que podem estar associadas à sensibilização das células à ação do fármaco cisplatina. No caso do extrato aquoso na presença de H_2O_2 , relativamente a H_2O_2 sozinho, também provoca alterações na composição química das células diferentes, que podem estar associadas à sensibilização das células à ação de H_2O_2 .

Em relação a células tratadas com cisplatina combinada com o padrão ácido clorogénico, quando comparadas com o controlo, ou comparadas com o tratamento com cisplatina sozinha, houve um aumento das razões $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)/\text{Amida II}$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\text{Amida II}$ e $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, que sugere um aumento de lípidos por quantidade de proteína nas células, aumento das cadeias lipídicas relativamente à quantidade proteica e que pressupõe alteração na composição dos lípidos totais. Na razão $\nu(\text{C}=\text{O})/\text{Amida II}$, em células tratadas com cisplatina combinada com o padrão ácido clorogénico, quando comparadas com o controlo, houve um aumento, que sugere aumento da quantidade de fosfolípidos na célula, enquanto que por outro lado, não se observa alterações significativas da combinação de cisplatina com ácido clorogénico comparando com cisplatina sozinha. Na razão $\nu(\text{C}=\text{O})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, não foram observadas alterações em células tratadas com a combinação de cisplatina e ácido clorogénico, em comparação com células controlo. Relativamente a células que foram expostas à combinação de cisplatina com ácido clorogénico, comparativamente com células expostas apenas a cisplatina, observa-se que houve uma diminuição dessa razão ($\nu(\text{C}=\text{O})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$), o que pressupõe a redução do teor de fosfolípidos na célula em relação à quantidade de lípidos (outras classes). Por fim na razão $\nu_s(\text{PO}_2^-)/\text{Amida II}$ houve aumento de ácidos nucleicos em células tratadas com cisplatina combinada com o padrão ácido clorogénico, quando comparadas com o controlo, ou comparadas com o tratamento com cisplatina sozinha.

Os resultados descritos a cima, sugerem que na presença de ácido clorogénico com cisplatina observa-se alterações na composição química das células diferentes da cisplatina sozinha, que podem dever-se à sua capacidade citoprotetora na ação do fármaco.

Comparando o efeito de extrato aquoso com cisplatina e ácido clorogénico com cisplatina, conclui-se que as alterações na composição química das células, observadas acima provocadas pela presença de extrato aquoso em combinação com a cisplatina, na sensibilização das células à ação da cisplatina, não é devida ao ácido clorogénico presente no extrato, mas sim a outros compostos presentes.

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Nesta dissertação procurou avaliar-se o efeito *in vitro* do extrato da decocção, de folhas e caules secos, da planta *Artemisia absinthium* (obtida comercialmente), a nível celular, em linhas celulares cancerígenas humanas, e o efeito deste extrato vegetal em conjunto com um fármaco de quimioterapia do cancro.

Com este trabalho foi possível concluir que:

- i) O extrato aquoso da decocção, de folhas e caules secos, da planta *A. absinthium* era composto por compostos fenólicos, maioritariamente flavonoides e ácidos fenólicos, tendo sido os principais compostos o ácido clorogénico e cinarina;
- ii) A simulação do metabolismo *in vitro* da decocção da planta, por ação do suco gástrico e pancreático, mostrou que a maioria dos compostos presentes na decocção não foram hidrolisados na digestão gástrica, no entanto alguns destes compostos sofreram alterações pela digestão pancreática;
- iii) O extrato aquoso apresentou atividade antioxidante *in vitro*, pela capacidade de extinção do radical DPPH, na mesma ordem de grandeza de BHT;
- iv) O extrato aquoso da planta em estudo não é citotóxico para as células HeLa, MCF-7 e Caco-2, no entanto estas responderam de forma diferente às concentrações de extrato testadas. Assim conclui-se que a decocção de *A. absinthium* não é eficaz contra as linhas celulares cancerígenas;
- v) O extrato aquoso em concentrações sub-tóxicas provocou alterações na composição bioquímica de células HeLa e MCF-7 observadas por espectroscopia de FTIR, que sugerem que pode estar a provocar morte celular por apoptose;
- vi) A análise eletroforética SDS-PAGE revelou que o extrato da planta, em concentrações sub-tóxicas não alterou a expressão de proteínas do citosol de células HeLa, mas levou a alterações na expressão de proteínas em células MCF-7. No entanto na análise do perfil proteico de ambas estas células expostas ao extrato, por HPLC-DAD, em ambos os casos houve alteração dos perfis proteicos;
- vii) O extrato de *A. absinthium* em concentração sub-tóxica aumentou o efeito citotóxico do fármaco de quimioterapia cisplatina, em células HeLa;
- viii) O extrato aquoso em concentração sub-tóxica em conjunto com a cisplatina provocou alterações na composição química das células HeLa, diferentes das alterações provocadas por cisplatina sozinha, observadas por espectroscopia de FTIR.

Estes resultados mostram que a ação da decocção da planta *A. absinthium* por si só não é muito eficaz contra as linhas celulares cancerígenas testadas, mas que ingerida em simultâneo durante a quimioterapia do cancro com cisplatina pode ter efeitos no mecanismo de ação do fármaco.

De futuro, para continuação deste trabalho, seria importante avaliar também a expressão de proteínas do citosol das células HeLa e MCF-7, quando expostas a extrato da planta, por análise de eletroforese bidimensional, para compreender que proteínas podem estar a ser alteradas, uma vez que foram observadas alterações nos perfis proteicos destas células. Seria ainda importante realizar-se ensaios com uma linha celular normal (não tumoral), como controlo, de modo a testar a toxicidade do extrato aquoso de *A. absinthium* em combinação com cisplatina em células normais.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, R., Mirza, Z., Ashraf, G. M., Kamal, M. A., Ansari, S. A., Damanhour, G. A., Abuzenadah, A. D., Chaudhary, A. G., Sheikh, I. A. (2012). New Anticancer Agents: Recent Developments in Tumor Therapy. *Anticancer research*, 32(7), 2999–3006.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, 33(10), 2202–2210.
- Baba, A. I., & Câtoi, C. (2007). CARCINOGENESIS. Em *Comparative Oncology*. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bhosle, J., & Hall, G. (2009). Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, 27(4), 173–177.
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131(4), 1466–1472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.030>
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317–333.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157–2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Canadanovic-Brunet, J. M., Djilas, S. M., Cetkovic, G. S., & Tumbas, V. T. (2005). Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 265–272. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1950>
- Chirino, Y. I., & Pedraza-Chaverri, J. (2009). Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(3), 223–242. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.09.003>
- Chlopčíková, Š., Psotová, J., Míketová, P., Soušek, J., Lichnovský, V., & Šimánek, V. (2004). Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. *Phytotherapy Research*, 18(5), 408–413. <https://doi.org/10.1002/ptr.1461>
- Chowdhury, I., Tharakan, B., & Bhat, G. (2006). Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(4), 506–525. <https://doi.org/10.2478/s11658-006-0041-3>
- Clifford, M. N., Knight, S., & Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3821–3832. <https://doi.org/10.1021/jf050046h>
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

- Derenne, A., Gasper, R., & Goormaghtigh, E. (2011). The FTIR spectrum of prostate cancer cells allows the classification of anticancer drugs according to their mode of action. *Analyst*, 136(6), 1134–1141. <https://doi.org/10.1039/c0an00872a>
- Du, W.-Y., Chang, C., Zhang, Y., Liu, Y.-Y., Sun, K., Wang, C.-S., Wang, M.-X., Liu, Y., Wang, F., Fan, J.-Y., Li, P.-T., Han, J.-Y. (2013). High-dose chlorogenic acid induces inflammation reactions and oxidative stress injury in rats without implication of mast cell degranulation. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(1), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.01.042>
- Efferth, T., Dunstan, H., Sauerbrey, A., Miyachi, H., & Chitambar, C. R. (2001). The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *International journal of oncology*, 18(4), 767–773.
- Elumalai, A., & Eswariah, M. C. (2012). HERBALISM – A REVIEW. *International Journal of Phytotherapy*, 2(2), 96–105.
- English, M. W. (Ed.). (2010). Principles of chemotherapy. *Paediatrics and Child Health*, 20(3), 123–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.paed.2009.10.003>
- Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 1), 69–75.
- Fale, P. L., Altharawi, A., & Andrew Chan, K. L. (2015). *In situ* Fourier transform infrared analysis of live cells' response to doxorubicin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(10), 2640–2648. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.018>
- Falé, P. L., Ferreira, C., Rodrigues, A. M., Cleto, P., Madeira, P. J. A., Florêncio, M. H., Frazão, F. N., Serralheiro, M. L. M. (2013). Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(20), 1370–1378. <https://doi.org/10.5897/JMPR13.4438>
- Falé, P. L. V. (2011). *Biological activities of Plectranthus barbatus aqueous extracts. In vitro and in vivo studies of activity, bioavailability and metabolism* (Tese de Doutoramento em Bioquímica). Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências.
- Falé, P. L. V., Madeira, P. J. A., Florêncio, M. H., Ascensão, L., & Serralheiro, M. L. M. (2011). Function of *Plectranthus barbatus* herbal tea as neuronal acetylcholinesterase inhibitor. *Food Funct.*, 2(2), 130–136. <https://doi.org/10.1039/C0FO00070A>
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., & Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 63(6), 965–981.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Obtido 30 de Maio de 2017, de <http://globocan.iarc.fr>
- Ferreira, M. L. F., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>

- Gasparri, F., & Muzio, M. (2003). Monitoring of apoptosis of HL-60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemical Journal*, 369(2), 239–248.
- Gasper, R., Dewelle, J., Kiss, R., Mijatovic, T., & Goormaghtigh, E. (2009). IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(6), 1263–1270. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.02.016>
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008). Online Identification of Chlorogenic Acids, Sesquiterpene Lactones, and Flavonoids in the Brazilian Arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) Leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a Validated HPLC-DAD Method for Their Simultaneous Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1193–1204. <https://doi.org/10.1021/jf072812l>
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., & Palazón, J. (2013). Phenolic Acids. Em K. G. Ramawat & J. M. Mérillon (Eds.), *Natural Products* (pp. 1951–1973). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_64
- Gouveia, S. C., & Castilho, P. C. (2013). *Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. *Industrial Crops and Products*, 45, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.022>
- Greenwell, M., & Rahman, P. (2015). Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 6(10), 4103–4112.
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Han, J., Ye, M., Qiao, X., Xu, M., Wang, B., & Guo, D.-A. (2008). Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(3), 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.02.013>
- Hoffmann, B., & Herrmann, K. (1982). Flavonol glycosides of mugwort (*Artemisia vulgaris*), tarragon (*Artemisia dranunculus*) and absinthe (*Artemisia absinthium*). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 174, 211–215.
- Hollman, P. C. H., & Katan, M. B. (1999). Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 937–942.
- Huang, R. T., Lu, J. F., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2015). Determination of phenolic acids and flavonoids in *Rhinacanthus nasutus* (L.) kurz by high-performance-liquid-chromatography with photodiode-array detection and tandem mass spectrometry. *Journal of Functional Foods*, 12, 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.002>
- Irshad, S., Mannan, A., & Mirza, B. (2011). Antimalarial activity of three Pakistani medicinal plants. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 24(4), 589–591.
- Jardim Botânico UTAD. (2017). *Artemisia absinthium*. Obtido 15 de Junho de 2017, de https://jb.utad.pt/especie/Artemisia_absinthium
- Jun, N. J., Jang, K. C., Kim, S. C., Moon, D. Y., Seong, K. C., Kang, K. H., Tandang, L., Kim, P. H., Cho, S. K., Park, K. H. (2007). Radical Scavenging Activity and Content of Cynarin (1,3-dicaffeoylquinic acid) in Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Appl. Biol. Chem.*, 50(4), 244–248.
- King, A., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of The American Dietetic Association*, 99(2), 213–218.

- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., & Xu, Y. (2000). Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Human & Experimental Toxicology*, 19(10), 543–555.
- Kooti, W., Servatyari, K., Behzadifar, M., Asadi-Samani, M., Sadeghi, F., Nouri, B., & Marzouni, H. Z. (2017). Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 1–14. <https://doi.org/10.1177/2156587217696927>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kweon, M.-H., Hwang, H.-J., & Sung, H.-C. (2001). Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4646–4655. <https://doi.org/10.1021/jf010514x>
- Leonti, M., Casu, L., Sanna, F., & Bonsignore, L. (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited? *Journal of Ethnopharmacology*, 121(2), 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.10.027>
- Lind, M. J. (2008). Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine*, 36(1), 19–23.
- Liu, E.-H., Qi, L.-W., Wu, Q., Peng, Y.-B., & Li, P. (2009). Anticancer Agents Derived from Natural Products. *Mini-reviews in medicinal chemistry*, 9(13), 1547–1555.
- Llorent-Martínez, E. J., Spínola, V., Gouveia, S., & Castilho, P. C. (2015). HPLC-ESI-MSⁿ characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. *Industrial Crops and Products*, 69, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.014>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Marques, V., & Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113(4), 1370–1376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.086>
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103(3), 778–786. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.017>
- Melguizo-Melguizo, D., Diaz-de-Cerio, E., Quirantes-Piné, R., Švarc-Gajić, J., & Segura-Carretero, A. (2014). The potential of *Artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 10, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.019>
- Mignolet, A., Derenne, A., Smolina, M., Wood, B. R., & Goormaghtigh, E. (2016). FTIR spectral signature of anticancer drugs. Can drug mode of action be identified? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864(1), 85–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.08.010>
- Minagawa, Y., Kigawa, J., Itamochi, H., Kanamori, Y., Shimada, M., Takahashi, M., & Terakawa, N. (1999). Cisplatin-resistant HeLa Cells Are Resistant to Apoptosis via p53-dependent and-independent Pathways. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(12), 1373–1379.

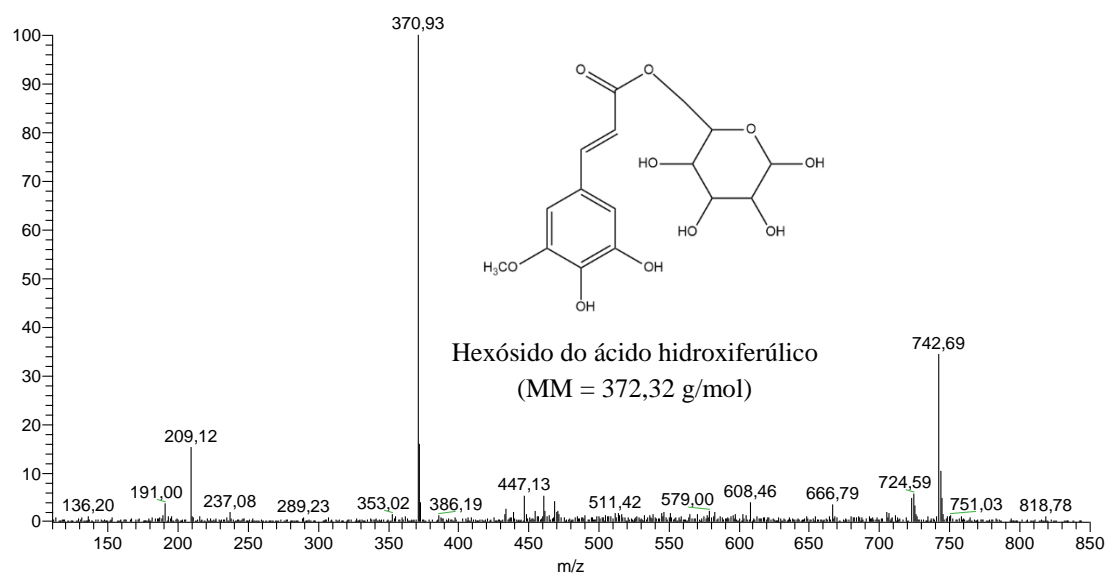
- Ministério da Saúde. (2012). *Cadernos de Atenção Básica: Práticas integrativas e complementares - plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica*. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica.
- Mohammadian, A., Moradkhani, S., Ataei, S., Shayesteh, T. H., Sedaghat, M., Kheiripour, N., & Ranjbar, A. (2016). Antioxidative and hepatoprotective effects of hydroalcoholic extract of *Artemisia absinthium* L. in rat. *J HerbMed Pharmacol*, 5(1), 29–32.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2), 211–219.
- Monsuez, J.-J., Charniot, J.-C., Vignat, N., & Artigou, J.-Y. (2010). Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *International Journal of Cardiology*, 144(1), 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.03.003>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1–2), 55–63.
- Nagaprashantha, L. D., Vatsyayan, R., Singhal, J., Fast, S., Roby, R., Awasthi, S., & Singhal, S. S. (2011). Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. *Biochemical Pharmacology*, 82(9), 1100–1109. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.078>
- Nguyen, H. T., & Németh, Z. É. (2016). Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.07.005>
- Nikhat, S., Ahmad, S., Akhtar, J., & Jamil, S. (2013). Phytochemical and ethnopharmacological perspective of Afsantin (*Artemisia absinthium* Linn.). *Ann Phytomed*, 2(2), 105–109.
- Nunes, H., Falé, P., Duarte, M. F., Serralheiro, M. L. M. O. M., Borba, A., & Moreira da Silva, F. (2014). *Pittosporum undulatum* and *Hedychium gardnerianum* nutritive value and secondary metabolites on cattle reproductive performances. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 22(2), 1–9.
- Oonsivilai, R., Ferruzzi, M. G., & Ningsanond, S. (2008). Antioxidant activity and cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) extracts. *As. J. Food Ag-Ind.*, 1, 116–128.
- Park, W. H. (2014). Anti-apoptotic effect of caspase inhibitors on H₂O₂-treated HeLa cells through early suppression of its oxidative stress. *Oncology Reports*, 31(5), 2413–2421. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3084>
- Petrovska, B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1–5. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>
- Pohl, P., Dzimitrowicz, A., Jedryczko, D., Szymczycha-Madeja, A., Welna, M., & Jamroz, P. (2016). The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.042>
- Porfírio, S., Falé, P. L. V., Madeira, P. J. A., Florêncio, M. H., Ascensão, L., & Serralheiro, M. L. M. (2010). Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after *in vitro* gastrointestinal metabolism. *Food Chemistry*, 122(1), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.044>

- Robbins, R. J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 19–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957>
- Sak, K. (2012). Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents. *Chemotherapy Research and Practice*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/282570>
- Serralheiro, M. L. M., & Cabral, J. M. S. (1999). Irreversible thermoinactivation of α -chymotrypsin in buffer and water miscible organic solvent. Comparison with a reverse micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7(1), 191–205.
- Shafi, G., Hasan, T. N., Syed, N. A., Al-Hazzani, A. A., Alshatwi, A. A., Jyothi, A., & Munshi, A. (2012). *Artemisia absinthium* (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. *Molecular Biology Reports*, 39(7), 7373–7379. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1569-0>
- Shahidi, F., & Naczsk, M. (2003). Biosynthesis, Classification, and Nomenclature of Phenolics in Food and Nutraceuticals. Em *Phenolics in Food and Nutraceuticals* (pp. 1–16). Boca Raton: CRC Press.
- Sharma, U. K., Pegu, S., Hazarika, D., & Das, A. (2012). Medico-religious plants used by the Hajong community of Assam, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(3), 787–800. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.053>
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265–7279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>
- Simirgiotis, M. J., Caligari, P. D. S., & Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 115(2), 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.071>
- Singh, R., Verma, P., & Singh, G. (2012). Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 1(2), 101–104. <https://doi.org/10.5455/jice.20120525014326>
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15(1), 71–81.
- Sridhar, T., & Symonds, R. P. (2009). Principles of chemotherapy and radiotherapy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 19(3), 61–67.
- Stewart, B. W., & Kleihues, P. (Eds.). (2003a). The global burden of cancer. Em *World Cancer Report* (pp. 11–19). Lyon: IARC Press.
- Stewart, B. W., & Kleihues, P. (Eds.). (2003b). Mechanisms of tumour development. Em *World Cancer Report* (pp. 83–125). Lyon: IARC Press.
- Stewart, B. W., & Kleihues, P. (Eds.). (2003c). The causes of cancer. Em *World Cancer Report*. Lyon: IARC Press.
- Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley.

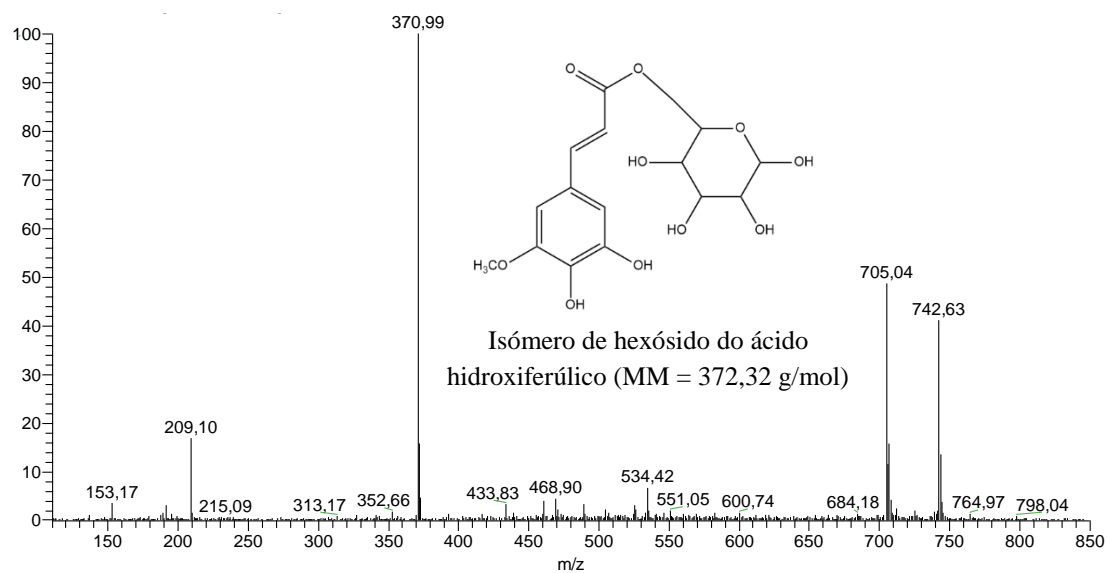
- Tao, J. J., Visvanathan, K., & Wolff, A. C. (2015). Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *The Breast*, 24, S149–S153. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.035>
- Tardito, S., Isella, C., Medico, E., Marchiò, L., Bevilacqua, E., Hatzoglou, M., Bussolati, O., Franchi-Gazzola, R. (2009). The Thioxotriazole Copper(II) Complex A0 Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Paraptotic Death in Human Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24306–24319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.026583>
- Temraz, A., & El-Tantawy, W. H. (2008). Characterization of antioxidant activity of extract from *Artemisia vulgaris*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 21(4), 321–326.
- Tobyn, G., Denham, A., & Whitelegg, M. (2011). *Artemisia absinthium*, wormwood. Em *Medical Herbs* (pp. 105–121). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10344-5.00016-1>
- Tsuchiya, T., Suzuki, O., & Igarashi, K. (1996). Protective Effects of Chlorogenic Acid on Paraquat-induced Oxidative Stress in Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(5), 765–768. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.765>
- Wang, H., Khor, T. O., Shu, L., Su, Z.-Y., Fuentes, F., Lee, J.-H., & Kong, A.-N. T. (2012). Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(10), 1281–1305.
- Weiss, R. B., & Christian, M. C. (1993). New Cisplatin Analogues in Development. *Drugs*, 46(3), 360–377.
- World Health Organization. (2002). WHO traditional medicine strategy 2002-2005. Geneva.
- World Health Organization. (2017, Fevereiro). Cancer Fact sheets. Obtido 28 de Maio de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Wright, C. W. (Ed.). (2002). *Artemisia absinthium*. Em *Artemisia*. London ; New York: Taylor & Francis.
- Wu, B.-B., Gong, Y.-P., Wu, X.-H., Chen, Y.-Y., Chen, F.-F., Jin, L.-T., Cheng, B.-R., Hu, F., Xiong, B. (2015). Fourier transform infrared spectroscopy for the distinction of MCF-7 cells treated with different concentrations of 5-fluorouracil. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0468-2>

CAPÍTULO VII

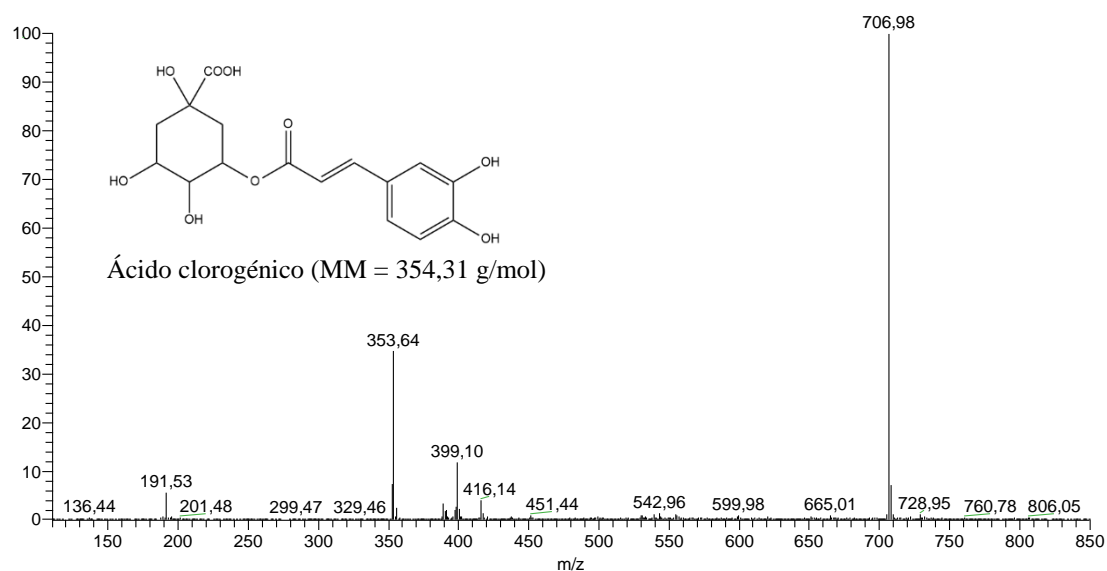
ANEXOS



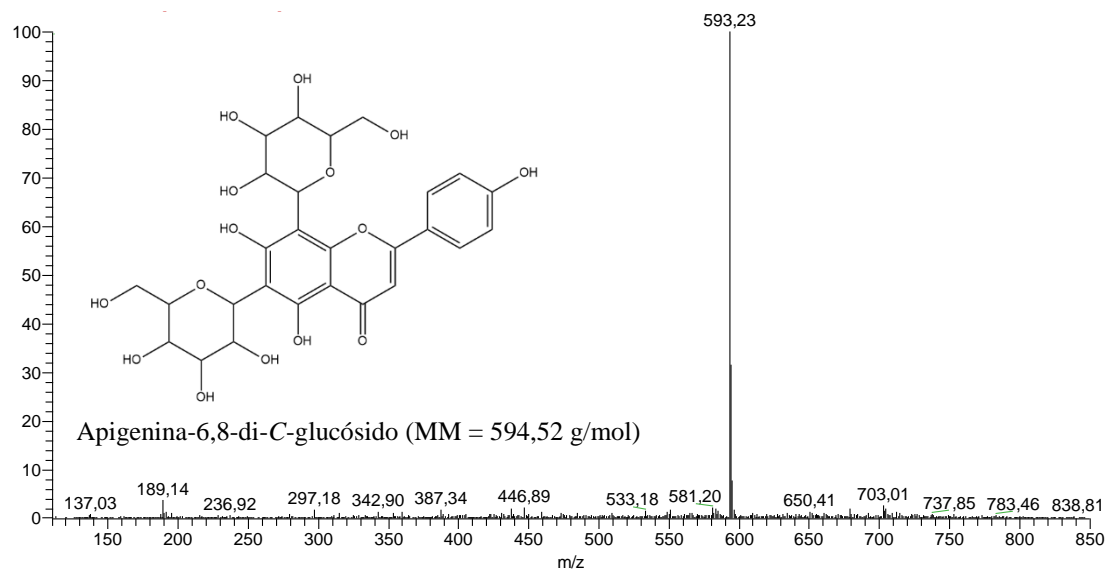
Anexo A: Espectro LC-MS e estrutura química proposta do composto 1 (Tr = 5,32 min).



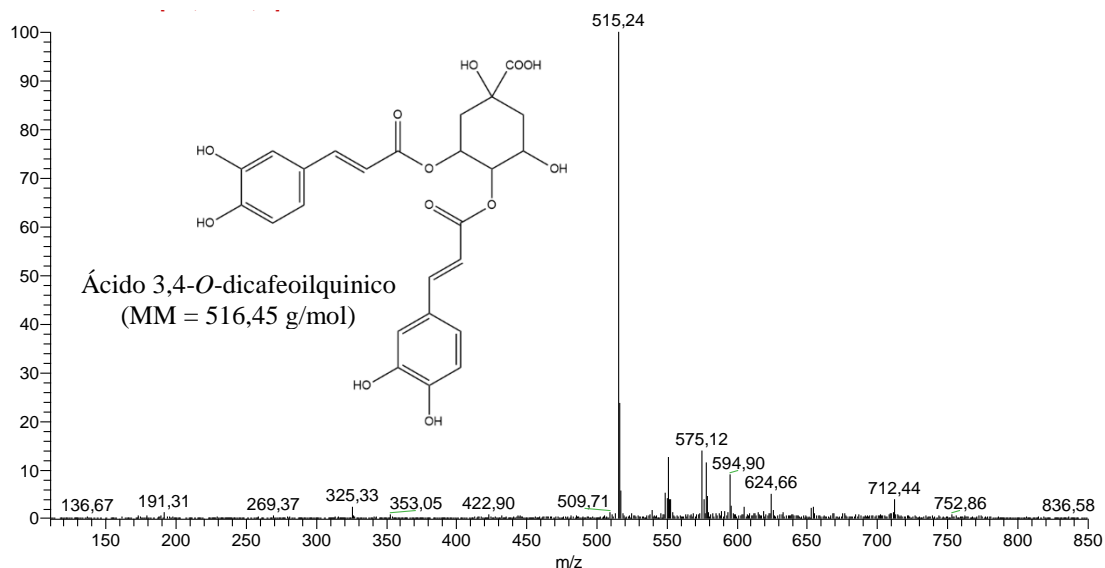
Anexo B: Espectro LC-MS e estrutura química proposta do composto 2 (Tr = 6,26 min).



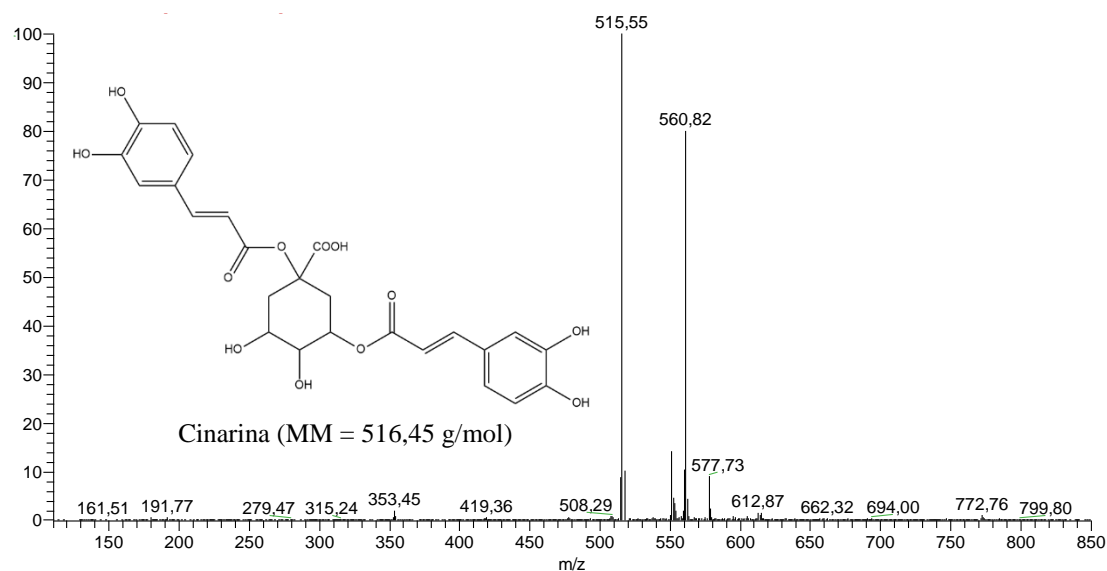
Anexo C: Espectro LC-MS e estrutura química proposta do composto 3 (Tr = 8,49 min).



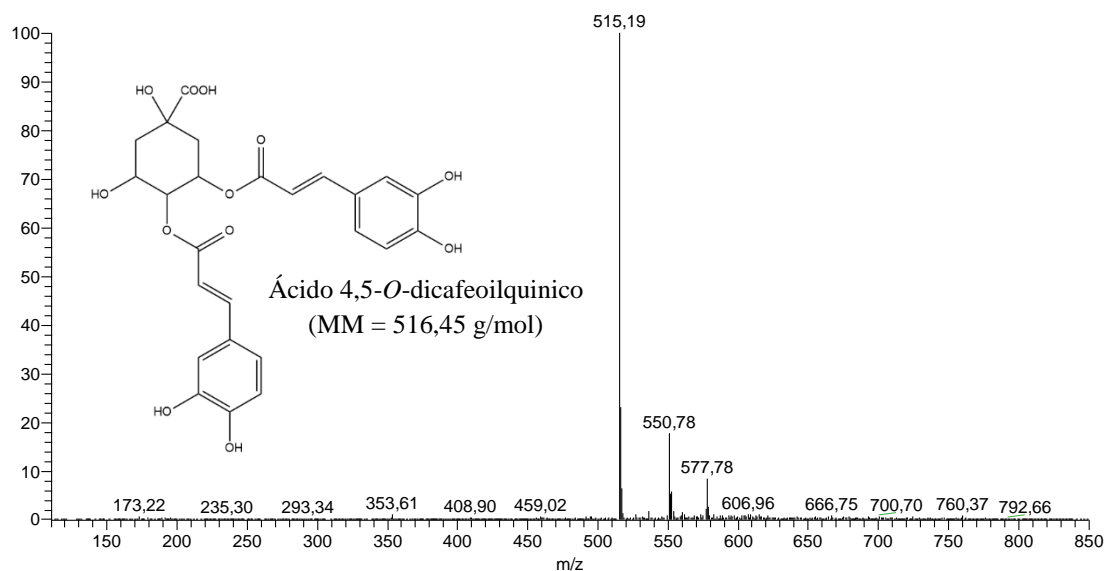
Anexo D: Espectro LC-MS e estrutura química proposta do composto 4 (Tr = 9,93 min).



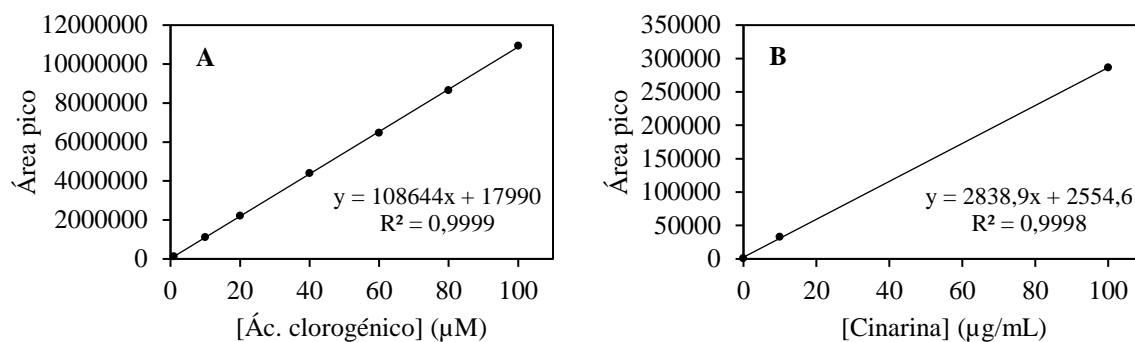
Anexo E: Espectro LC-MS e estrutura química proposta do composto 5 (Tr = 12,79 min).



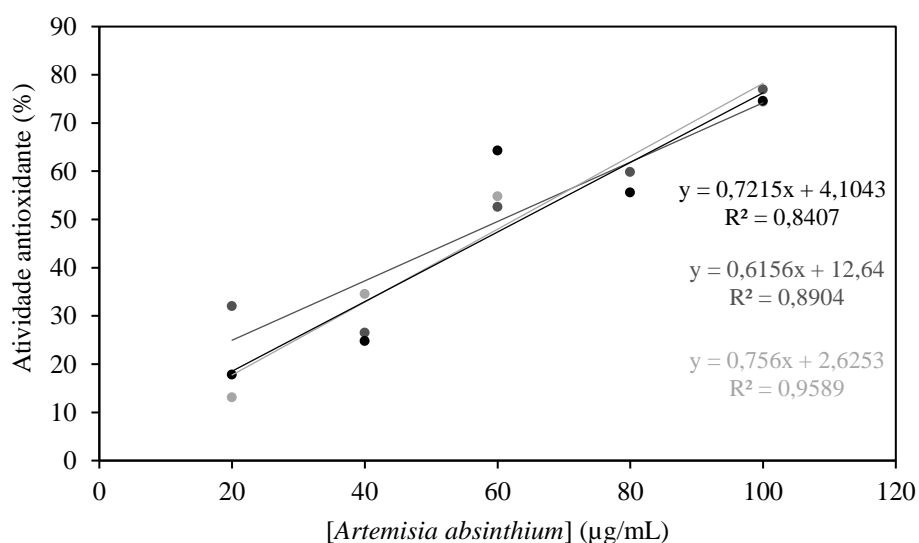
Anexo F: Espectro LC-MS e estrutura química proposta do composto 6 (Tr = 13,23 min).



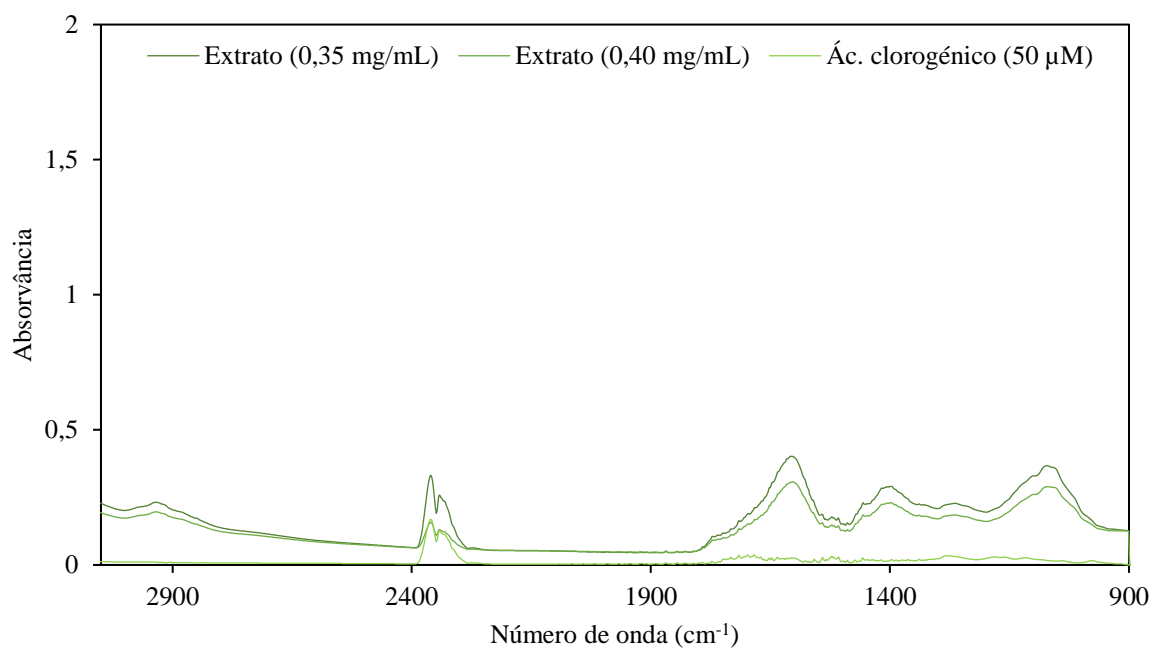
Anexo G: Espectro LC-MS e estrutura química proposta do composto 7 (Tr = 14,60 min).



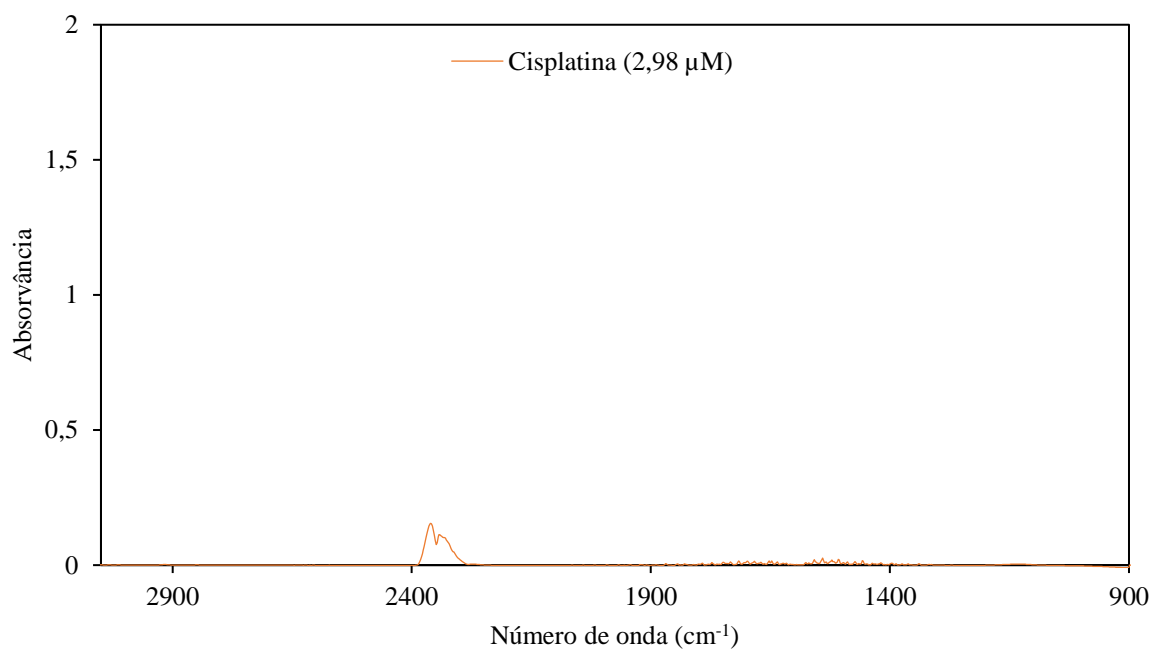
Anexo H: Retas de calibração do A) padrão ácido clorogénico (µM) e B) padrão cinarina (µg/mL).



Anexo I: Retas de regressão linear da atividade antioxidante (%) em função da concentração do extrato aquoso de *A. absinthium*. Ensaio realizado em triplicado para cada uma das concentrações. Na reta cinzento claro não se incluiu o valor correspondente à concentração de 80 µg/mL.



Anexo J: Espectros médios de FTIR de extrato aquoso de *A. absinthium* (0,35 mg/mL e 0,40 mg/mL) e de ácido clorogénico (50 µM). Os espectros são a média de três medições.



Anexo K: Espectro médio de FTIR de cisplatina (2,98 µM). O espectro é a média de três medições.